

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**ANÁLISIS FUNCIONAL DE FORMAS MUTADAS DE LA
PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO
DEL PEPINO EXPRESADAS CONSTITUTIVAMENTE EN
PLANTAS DE “NICOTIANA TABACUM”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Margarita Ruiz del Pino

Bajo la dirección de la doctora

Isabel García Luque

Madrid, 2003

ISBN: 978-84-697-1416-4

© Margarita Ruiz del Pino, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. Microbiología III

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE FORMAS MUTADAS DE LA
PROTEÍNA DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL
PEPINO EXPRESADAS CONSTITUTIVAMENTE EN PLANTAS
DE *NICOTIANA TABACUM*.**

Margarita Ruiz del Pino

Madrid, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. Microbiología III

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE FORMAS MUTADAS DE LA PROTEÍNA
DE MOVIMIENTO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO
EXPRESADAS CONSTITUTIVAMENTE EN PLANTAS DE *NICOTIANA
TABACUM*.**

Vº Bº Tutor de Tesis

Vº Bº Director de tesis

Dra. C. Vázquez Estébez

Dra. I. García Luque

Madrid, 2003

Memoria presentada por Margarita Ruiz del Pino para optar al grado de de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 2003

A mamá

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas gracias a la financiación del Programa de Formación de Personal Investigador de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Isabel García Luque, directora de esta tesis, por su constante apoyo, interés y colaboración en la realización de la misma, por haber sido mi fuente de conocimientos científicos y por supuesto, por sus palabras de ánimo en todo momento.

A la Dra. M^a Teresa Serra, por haber tenido siempre tiempo para escucharme y por regalarme tantos sabios y siempre certeros consejos. También darle las gracias por cederme amablemente los sueros que he utilizado en este trabajo.

A la Dra. Covadonga Vázquez Estévez, por haber aceptado ser mi tutora y por su inestimable ayuda. Al Dr. José Martínez Peinado, por admitir la presentación de esta tesis en el Dpto. de Microbiología III.

A los Dres. Peter Palukaitis y Tomás Cantó, por haberme proporcionado gentilmente el virus CMV-Fny Δ Kpn. A la Dra. Carmen Castresana, por ofrecerme su laboratorio cuando lo he necesitado.

A los Dres. José Ramón Díaz y Dionisio López, por haber estado disponibles en todo momento.

A "los de en frente": Virginia, Belén, César, Pablo, Marisol, Félix, Paco, Juanjo, Lourdes, Dani y Elisa. A los "in situ": Alfonso, Mercedes, Myriam, Gema, Isra, Antonio y Marta. A todos, gracias por el día a día, por vuestro compañerismo y amistad. A Tomás Cascón, del CNB, por su clase magistral de Northern-blot.

A mis "ángeles": a Sonia, por haber sido mi maestra en los comienzos, por los diez minutitos de inglés y por enfadarse cada vez menos cuando soy impuntual; a Marisa, *mae*, por TODO en general y naturalmente, por haber enriquecido mi vocabulario con palabras del ¿castellano antiguo?; a M^a Ángeles, por haber estado siempre ahí con la mejor de tus sonrisas para todo lo que he necesitado y cómo no, por "invitarme" amablemente todas las mañanas a un donut; a Patricia, por tener siempre respuestas a

mis preguntas, porque no hay más post-p como tú, a Arantxa, por recordarme siempre la palabra “mágica” en los momentos que estaba tocando fondo y a las dos, por enseñarme que en Madrid puedes ser “pija” en cualquier barrio. Y cómo no, a los esposos de los ángeles: Javi, Manolo y Javi, “el paracaidista”, gracias por vuestro cariño y amistad.

A Verónica, por aquellos años inolvidables de convivencia entre la niebla. Vero, tenemos que dejar de fumar.

A mi gran amigo Pedro, gracias por todo, tanto a nivel profesional como personal. Sirves “*pa un roto y pa un descosio*”, no hay dos gallegos como tú.

A la familia Guijarro-García, por tener siempre las puertas de su casa abiertas para mí.

A todo el personal de los servicios del C.I.B, en especial a Mónica y Vicky, por su profesionalidad, amistad y por haber hecho “posible lo imposible” y, a Mario, por el modelado de la proteína.

A mi Cristóbal, por ayudarme a ver la vida a través de un prisma tan sencillo, por quererme tanto, por hacerme tan feliz, por *mil* razones. Te devolveré todo el tiempo y sonrisas que te he robado.

A mis hermanos: Laura, A. Jesús, Olga y Machi. Gracias por vuestro incondicional apoyo, por vuestro cariño y, sobre todo, por vuestra paciencia y comprensión. Gracias por estar siempre animándome, por ser como sois.

Y por supuesto, a mi mamita linda, gracias por ofrecermelo tu amor, tu energía, tus ganas de todo. Gracias por hacerme ver que el futuro puede ser fabuloso. Eres única. Gracias por ser mi madre.

ABREVIATURAS	17
VIRUS CITADOS	19
OBJETIVOS	21
1.- INTRODUCCIÓN	25
1.1.- El virus del mosaico del pepino	27
1.1.1.- Características generales	27
1.1.2.- Sintomatología	27
1.1.3.- Efectos citopatológicos	28
1.1.4.- Partículas virales	28
1.1.5.- Genoma viral	29
1.1.6.- Características y funciones de las proteínas de CMV	30
1.1.6.1.- Proteínas 1a y 2a	31
1.1.6.2.- Proteína 2b	32
1.1.6.3.- Proteína 3a o de movimiento (MP)	32
1.1.6.3.- Proteína de cubierta (CP)	33
1.2.- Replicación viral	35
1.3.- Movimiento viral: célula a célula y larga distancia	37
1.3.1.- Movimiento de célula a célula	38
1.3.2.- Movimiento a larga distancia	41
1.3.3.- Factores del huésped implicados en el movimiento viral	43
1.4.- Mecanismos de resistencia en plantas	44
1.4.1.- Reacción hipersensible (HR)	45
1.4.2.- Silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS)	46
1.5.- Control de las enfermedades virales	47
1.5.1.- Resistencia mediada por la CP	49
1.5.2.- Resistencia mediada por la replicasa	51
1.5.3.- Resistencia mediada por proteínas de movimiento	52
1.5.4.- Resistencia mediada por RNAs antisentido	54
1.5.5.- Resistencia mediada por RNA satélites	54
1.5.6.- Resistencia mediada por RNAs bicatenarios	55
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1.- Materiales	59

2.1.1.- Virus	59
2.1.2.- Plantas	59
2.1.3.- Estirpes bacterianas	59
2.1.4.- Plásmidos.....	59
2.1.5.- Oligonucleótidos.....	60
2.1.6.- Sueros policlonales e IgGs.....	60
2.1.7.- Tampones y soluciones generales.....	60
2.1.8.- Medios de cultivo	62
2.2.- Métodos	62
2.2.1.-Propagación de las plantas	62
2.2.2.- Inoculación de las plantas.....	62
2.2.3.- Purificación de virus.....	63
2.2.4.- Extracción de los RNAs de viriones	63
2.2.5.- Extracción de RNA total de plantas.....	63
2.2.6.- Extracción del DNA genómico de plantas	63
2.2.7.- Purificación de DNA plasmídido	64
2.2.8.- Determinaciones espectrofotométricas.....	64
2.2.9.- Electroforesis de ácidos nucleicos.....	64
2.2.10.- Elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa	64
2.2.11.- Manipulación enzimática del DNA	64
2.2.12.- Secuenciación de DNA.....	65
2.2.13.- Transcripción inversa	65
2.2.14.- Amplificación de fragmentos de DNA por PCR	65
2.2.15.- Obtención de sondas de DNA	65
2.2.16.- Obtención de sondas de RNA	66
2.2.17.- Transferencia e hibridación de los RNAs totales (Northern-blot)	66
2.2.18.- Detección de los RNAs virales en improntas de tejido	67
2.2.19.- Fraccionamiento subcelular del tejido vegetal.....	67
2.2.20.- Extracción de proteínas totales	68
2.2.21.- Detección de proteínas ("Western-blot").....	68
2.2.22.- Recogida de muestras. Detección y cuantificación de CMV mediante ensayos de ELISA-DAS. Análisis de datos	69

2.2.23.- Análisis computacional de la proteína 3a	70
3.- RESULTADOS	71
3.1.- Caracterización de las plantas M2.....	73
3.1.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM2	73
3.1.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM2 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24.....	78
3.1.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	79
3.1.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	79
3.1.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	80
3.1.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM2 en plantas de tabaco de la generación F2 frente a la infección de CMV-24.....	82
3.1.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	82
3.1.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	83
3.1.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	83
3.1.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M2	86
3.2.- Caracterización de las plantas M3.....	89
3.2.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM3	89
3.2.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM3 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24.....	91
3.2.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	92
3.2.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	92
3.2.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	94
3.2.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM3 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24.....	96
3.2.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	97
3.2.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	98
3.2.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	100
3.3.- Caracterización de las plantas M5.....	103
3.3.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína M5.....	103
3.3.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM5 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24.....	105
3.3.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	105

3.3.2.2.- Acumulación viral en hojas inoculadas	106
3.3.2.3.- Acumulación viral en hojas sistémicas	108
3.3.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM5 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24	110
3.3.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral	110
3.3.3.2.- Acumulación viral en hojas inoculadas	111
3.3.3.3.- Acumulación viral en hojas sistémicas	112
3.3.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M5	115
3.4.- Caracterización de las plantas M6	117
3.4.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína M6.....	117
3.4.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M6 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24	119
3.4.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral	119
3.4.2.2.- Acumulación viral en hojas inoculadas	120
3.4.2.3.- Acumulación viral en hojas sistémicas	122
3.4.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M6 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24	124
3.4.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral	125
3.4.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas	125
3.4.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas	126
3.4.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M6.....	128
3.5.- Caracterización de las plantas M8	131
3.5.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM8	131
3.5.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M8 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24	136
3.5.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral	136
3.5.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas	136
3.5.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas	138
3.5.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M8 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24	141
3.5.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral	142
3.5.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas	142

3.5.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	144
3.5.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M8	145
3.6.- Caracterización de las plantas M9	147
3.6.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM9	147
3.6.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M9 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24.....	149
3.6.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	149
3.6.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	150
3.6.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	152
3.6.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM9 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24.....	154
3.6.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	155
3.6.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	155
3.6.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	157
3.6.4. Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M9.....	157
3.7.- Caracterización de las plantas M10	161
3.7.1.- Caracterización del transgén M10	161
3.7.2.- Análisis del efecto de la expresión del transgén M10 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24	162
3.7.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral.....	162
3.7.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	163
3.7.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	165
3.7.3.- Análisis del efecto de la expresión del transgén M10 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24	168
3.7.3.1.- Acumulación viral en las hojas inoculadas.....	168
3.7.3.2.- Acumulación viral en las hojas sistémicas.....	170
3.7.3.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M10	170
3.8.- Distribución subcelular de las diferentes proteínas deleccionadas	173
3.9.- Predicción estructural de la proteína p3a	174
4.- DISCUSIÓN	175
5.- CONCLUSIONES	191
6.- BIBLIOGRAFÍA	195

ABREVIATURAS

A:	Amstrong
aa:	aminoácido (s)
aptdo:	apartado
BrEt:	bromuro de etidio
BSA:	albúmina de suero bovino
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
Ci:	curio
CP:	proteína de la cápsida
col.:	colaboradores
c.p.m.:	cuentas por minuto
dCTP:	trifosfato de desoxicitidina
DNA:	ácido desoxirribonucleico
dNTPs:	desoxi-nucleótidos trifosfato
d.p.i.:	día(s) posterior(es) a la inoculación
DTT:	ditiotreitól
E2:	estructura secundaria
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetra-acético
ELISA-DAS:	ensayo inmunoenzimático de doble sandwich
Fig.:	figura
GFP:	proteína de fluorescencia verde
h:	horas
h.p.e.i.:	hoja(s) por encima de la(s) inoculada(s)
h.i.:	hoja inoculada
h.s.:	hoja sistémica
IgGs:	inmunoglobulinas G
IR:	región intergénica
J:	Julios
Kb:	kilobase
KDa:	kilodalton
Klenow:	Fragmento Klenow de la polimerasa DNA de <i>E. coli</i> .
mA:	miliamperio
M. y M.:	Materiales y Métodos
MOPS:	ácido 4-morfolinetanosulfónico
MP:	proteína de movimiento
min:	minuto
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
nº:	número
NC:	región no codificadora
npt II:	neomicina fosfotransferasa
nt:	nucleótido
ORF:	fase abierta de lectura
p3a:	proteína de movimiento de CMV
pb:	par de bases
PCR:	reacción de la polimerasa en cadena
PEG:	polietilenglicol
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonio
PTGS:	silenciamiento génico post-transcripcional
PVP:	polivinilpirrolidona
RNA:	ácido ribonucleico

RNAasa:	ribonucleasa
r.p.m.:	revoluciones por minuto
RT:	reacción deretrotranscripción
SDS:	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Tris:	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
seg:	segundo
rRNA:	ácido desoxirribonucéico ribosomal
u:	unidad
UV:	ultravioleta

VIRUS CITADOS

AMV:	Virus del mosaico de la alfalfa, alfamovirus
BDMV:	Virus del mosaico enano de la judía, geminivirus
BYV:	Virus de los amarillos de la remolacha, closterovirus
BWYV:	Virus de la amarillez de la remolacha del oeste, poleovirus
CaMV:	Virus del mosaico de la coliflor, caulimovirus
CCMV:	Virus del moteado clorótico del chícharo, bromovirus
CMMV:	Virus del moteado suave del crisantemo
CMV:	Virus del Mosaico del Pepino, cucumovirus
CPMV:	Virus del mosaico del chícharo, comovirus
CyMV:	Virus del mosaico del Cymbidium, potexvirus
CyRSV:	Virus de las manchas en anillo del Cymbidium, tombusvirus
BMV:	Virus del mosaico del bromo, bromovirus
GRV:	Virus de la roseta del cacahuete, umbravirus
ORSV:	Virus de las manchas anulares del Odontoglossum, tobamovirus
PAMV:	Virus del mosaico aucuba de la patata, potexvirus
PCV:	Virus del acaparamiento del cacahuete, pecluvirus
PEBV:	Virus del amarronamiento del guisante
PMMoV:	Virus del moteado suave del pimiento, tobamovirus
PSV:	Virus del Enanismo del Cacahuete, cucumovirus
PVX:	Virus X de la patata, Potexvirus
PVY:	Virus Y de la patata, potyvirus
TAV:	Virus de la aspermia del tomate, cucumovirus
TBSV:	Virus achaparrado peludo del tomate, tombusvirus
TCV:	Virus del arrugado del nabo, tombusvirus
TEV:	Virus del grabado del tabaco, potyvirus
TMV:	Virus del mosaico del tabaco, tobamosvirus
ToMV:	Virus del mosaico del tomate, tobamosvirus
ToMoV:	Virus del moteado del tomate, geminivirus
TRSV:	Virus de las manchas en anillo del tabaco, nepovirus
TSWS:	Virus de las manchas del bronceado de tomate, tospovirus
TVCV:	Virus del aclaramiento de venas del nabo, tobamovirus
TYMV:	Virus del mosaico amarillo del nabo, potexvirus
WCIMV:	Virus del mosaico del trébol blanco, potexvirus

OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo que constituye esta Tesis Doctoral han sido:

1.- Caracterización de las secuencias nucleotídicas del DNA y mRNA correspondientes al gen 3a de CMV-24 delecionado entre los nt Δ 741-779.

2.- Localización subcelular de diferentes mutantes de delección de la proteína de movimiento (p3a) de CMV-24 en plantas de *Nicotiana Tabacum* que las expresan de forma constitutiva.

3.- Análisis de la funcionalidad de diferentes proteínas p3a mutadas cuando son expresadas constitutivamente *in trans* por el huésped experimental.

4.- Prospección de la resistencia frente a CMV-24 en plantas transgénicas de tabaco que expresan constitutivamente diferentes mutantes de su proteína de movimiento (M2, M3, M5, M6, M8, M9 y M10).

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El virus del mosaico del pepino

1.1.1.- Características generales

El virus del mosaico del pepino (CMV) es el miembro tipo del género *Cucumovirus* que pertenece a la familia *Bromoviridae* (ICTV, 1995). Este género engloba a otros dos miembros: el virus de la aspermia del tomate (TAV) y el virus del enanismo del cacahuete (PSV). Todos ellos comparten semejanzas en la organización y expresión del genoma, en la morfología de sus partículas y en el vector de transmisión.

Los cucumovirus se transmiten fácilmente por inoculación mecánica aunque en la naturaleza se dispersan esencialmente por pulgones de manera no persistente (Watson y Plumb, 1973). CMV también puede transmitirse por semillas (Gallitelli, 2000; Palukaitis y col., 1992).

De acuerdo a las relaciones serológicas, mapas peptídicos de la CP, hibridación de ácidos nucleicos y similitud entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de sus proteínas, las cepas de CMV se han clasificado tradicionalmente en dos subgrupos, DTL y ToRS, actualmente red denominados I y II, que comparten un 75% de identidad en sus secuencias (Palukaitis y col., 1992). Generalmente, las cepas del subgrupo II se aíslan en regiones templadas del planeta. Recientemente se ha propuesto una subdivisión del subgrupo I en: IA y IB que está basada en los análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las distintas regiones del genoma viral (Roossinck y col., 1999; Roossinck, 2000).

1.1.2.- Sintomatología

CMV posee una amplia gama de huéspedes, siendo de todos los virus de plantas conocidos el que es capaz de infectar el mayor número. Se han descrito infecciones de este virus en más de 1200 especies de plantas, mono y dicotiledóneas, incluyendo un elevado número de cultivos agrícolas de importancia económica y malas hierbas (Edwardson y Christie, 1991; Palukaitis y col., 1992).

Los síntomas inducidos por CMV son muy variables, dependiendo de la combinación cepa viral-huésped, y abarcan desde la necrosis generalizada a la ausencia de síntomas aunque, generalmente consisten en mosaico de las hojas. Estos síntomas suelen agravarse en el campo porque son frecuentes las infecciones mixtas de CMV con otros virus no relacionados, como poty- o tobamovirus, produciéndose un fuerte sinergismo (vg. García-Luque y col., 1983). En el desarrollo de los diferentes

síntomas, además de la combinación cepa-huésped, influyen factores tales como las condiciones medioambientales, la combinación luz/temperatura y el estado fisiológico y de desarrollo de las plantas. Por otro lado, los síntomas característicos de la infección por CMV pueden ser modificados considerablemente por la presencia de determinadas secuencias de RNAs satélite. El caso más espectacular lo constituyen las variantes necrogénicas de estos satélites. Su presencia en las preparaciones de CMV provoca la necrosis generalizada de las plantas de tomate, alterando los síntomas de filiformismo típicos de la infección viral (Collmer y Howell, 1992; Kaper y Waterworth, 1981; Palukaitis y col., 1992).

1.1.3.- Efectos citopatológicos

Los efectos citopatológicos originados por la infección de CMV, no son exclusivos de éste y por tanto, por sí solos no son indicativos de la infección por el mismo (Palukaitis y col., 1992).

En general son dependientes de la combinación cepa de virus-planta huésped. Entre las distintas alteraciones causadas en la célula se encuentran la degeneración del cloroplasto a nivel del estroma y del sistema lamelar y en algunos casos, alteración de la mitocondria y el núcleo (Martelli y Russo, 1985). También la formación de estructuras vesiculares en el citoplasma asociadas al tonoplasto (Hatta y Francki, 1981; Hull, 2002; Martelli y Russo, 1985). Estas estructuras poseen fibrillas que muestran resistencia a la digestión por RNAsas bajo concentraciones de sal altas, sugiriendo la existencia de dobles cadenas de RNA (Hatta y Francki, 1981).

1.1.4.- Partículas virales

Las partículas de CMV, de 29 nm de diámetro, son isométricas. Están constituidas por 180 subunidades de una única proteína de 24,5 kDa, la proteína de cubierta (CP), agrupadas en 32 subunidades morfológicas. Tienen forma icosaédrica, con simetría T=3. El 18% del peso de estas partículas corresponde al RNA viral (Kaper y Waterworth, 1981) y se mantienen estables gracias a interacciones electrostáticas entre el RNA y la proteína de la cápsida (Kaper y Geelen, 1971). En las plantas infectadas se acumulan en el citoplasma, en disposición cristalina o no (Honda y Matsui, 1974; Rubio-Huertos, 1978), y en la vacuola (Blackman y col., 1998; Hatta y Francki, 1979). La presencia de las partículas en el núcleo de algunos huéspedes tales como *N. clevelandii* es un tema de controversia (Hatta y Francki, 1979; Hull, 2002).

1.1.5.- Genoma viral

El genoma de CMV se encuentra segmentado en tres moléculas de RNA de polaridad positiva denominadas RNA 1, 2 y 3, de un tamaño aproximado de 3,3, 3 y 2,2 Kb, respectivamente (Palukaitis y col., 1992). En su extremo 5' tienen una estructura CAP y en su extremo 3' un grupo hidroxilo (Palukaitis y col., 1992). Los 270 nucleótidos de la región 3'-terminal están muy conservados entre los distintos RNAs. Estas secuencias pueden adoptar estructuras de tRNA, que pueden ser aminoaciladas con tirosina (Gould y Symons, 1977; 1978) y proveen el sitio de unión para la RdRp promoviendo la síntesis de cadenas negativas (Boccard y Baulcombe, 1993).

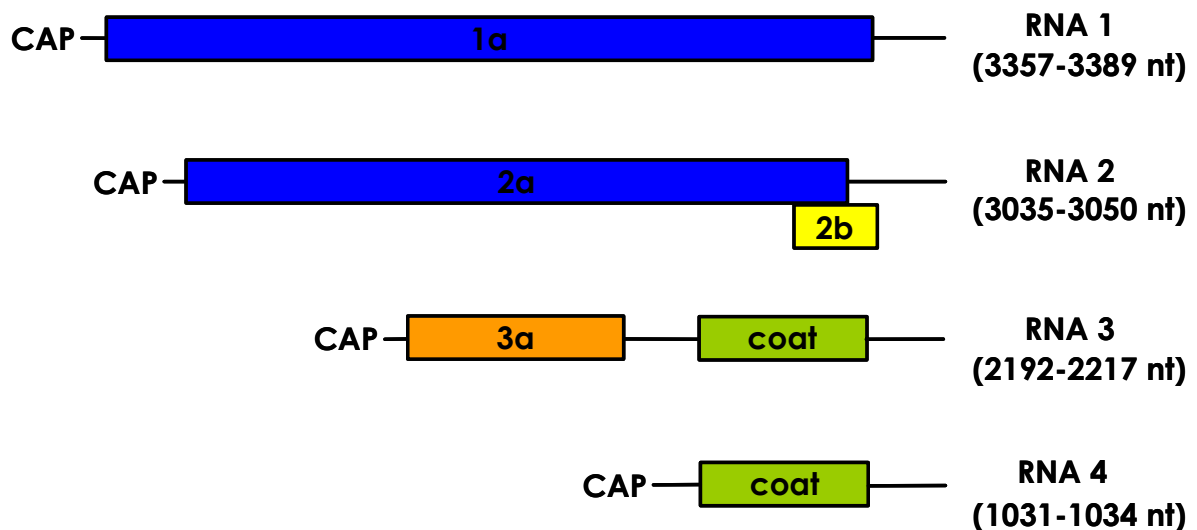


Fig. 1.1. Esquema de la organización genética de CMV

El RNA 1 posee una ORF que se traduce en una proteína de 111 kDa o proteína 1a. El RNA 2 contiene dos ORFs: una de ellas, situada en el extremo 5', se traduce en una proteína de 94 kDa o proteína 2a y la otra, localizada en el extremo 3' y solapando con la anterior, codifica para una segunda proteína de 12-13 kDa o proteína 2b. Ésta se traduce a partir del RNA 4a subgenómico (Ding y col., 1994). El RNA 3 tiene 2 ORFs: una en la región 5' que se traduce en una proteína de 30-31 kDa denominada proteína 3a o proteína de movimiento (MP) y otra en su región 3', que codifica para una proteína de 24,5 kDa denominada proteína de cubierta (CP). Ésta se traduce a partir del RNA 4 subgenómico.

Los RNAs subgenómicos también poseen una estructura CAP en la región 5'-terminal y un grupo hidroxilo en la región 3'-terminal (Ding y col., 1994; Palukaitis y col., 1992).

Los RNAs 1, 2 y 3 son imprescindibles para el establecimiento de la infección viral, si bien, los RNAs 1 y 2 y sus productos son suficientes para la replicación en protoplastos (Nitta y col., 1988), aunque el RNA 3 proporciona factores *in trans* que favorecen la eficacia de dicho proceso (Boccard y Baulcombe, 1993).

La existencia de un genoma dividido permitió la manipulación de los RNAs de los cucumovirus y la creación de virus quimeras entre distintos miembros del grupo, con la consiguiente adscripción de funciones a algunas de las proteínas virales antes del uso extensivo de la técnicas de DNA recombinante.

Además de estos RNAs, en los viriones de CMV se encuentran los denominados RNA 5 y 6. El RNA 5 –distinto del RNA satélite de igual nombre- se compone de una población mixta de RNAs derivados de la región 3'-terminal conservada de los RNAs genómicos 2 y 3 (Blanchard y col., 1996) y se ha encontrado en cepas de los diferentes subgrupos (Blanchard y col., 1997). El RNA 6 corresponde al RNA satélite. Estos RNAs de pequeño tamaño, 330-380 nt, necesitan al virus para su replicación, encapsidación y movimiento y no presentan homología de secuencia significativa con el mismo. Por tanto, se consideran parásitos moleculares. Su presencia en las preparaciones virales provoca una caída en los niveles de acumulación y una modificación de la sintomatología típica del virus que resulta generalmente en una reducción de la enfermedad si bien, en otros casos, producen un agravamiento de la misma (Collmer y Howell, 1992; Murant y Mayo, 1982).

Las moléculas de los RNAs genómicos 1 y 2 se encapsidan de forma independiente y la del RNA 3 lo hace junto al RNA 4. En base a la similitud de masas y coeficientes de sedimentación de las distintas partículas virales es concebible que los RNAs satélites lo hagan en cualquiera de las partículas, a excepción de las que contienen el RNA 1 (Kaper Waterworth, 1981).

1.1.6.- Características y funciones de las proteínas de CMV

Las proteínas de CMV poseen funciones pleiotrópicas: intervienen en el proceso de infección viral, interaccionan con el huésped y con los vectores y afectan a la patogenicidad y producción de síntomas

1.1.6.1.- Proteínas 1a y 2a

A semejanza de otras proteínas implicadas en la replicación viral, ambas proteínas contienen en sus secuencias, dominios conservados e indicativos de su actividad aunque, en ningún caso ésta se ha demostrado experimentalmente. Así, la proteína 1a presenta en la región N-terminal un dominio característico de actividad metiltransferasa –necesario para la formación de la estructura CAP-, y en la región C-terminal, un dominio conservado de helicasas, necesario para el desenrollamiento de los RNAs bicatenarios formados durante el proceso de la infección viral (Habili y col., 1989; Rozanov y col., 1992).

La proteína 2ª, en su región central, contiene el dominio típico de las RNAs polimerasas (Habili y col., 1989; Rozanov y col., 1992).

Ambas proteínas están implicadas en la replicación del genoma viral, formando parte del complejo de la replicasa junto con al menos, una proteína del huésped de 50 kDa (Hayes y Buck, 1990). Además, cuando son expresadas transgénicamente en la misma planta se genera un replicón viral capaz de replicar al RNA 3 (Suzuki y col., 1996). De forma similar, la replicación de los RNAs 2 y 3 puede ser complementada *in trans* por la expresión del RNA 1 (Canto y Palukaitis, 1998; Suzuki y col., 1996).

Cillo y col. (2002) estudiaron la distribución tisular de estas proteínas en plantas de tabaco y pepino. Estos autores las detectaron asociadas a los tonoplastos. Además, las mayores acumulación, las encontraron en las células de la túnica de las venas menores en plantas de tabaco, mientras que en plantas de pepino, lo hacían en las células del mesófilo y en las células epidérmicas, lo que podría indicar una replicación diferencial del virus en los distintos tipos de tejidos dependiendo de la especie.

Mediante ensayos *in vitro* se ha determinado que la interacción entre las proteínas 1a y 2a –necesaria para que se lleve a cabo la replicación, según el modelo propuesto para BMV (Smirnyagina y col., 1996)- está regulada por la fosforilación del extremo N-terminal de la proteína 2a, de forma que cuando ésta tiene lugar se impide dicha interacción (Kim, S-H y col., 2002). La interacción se lleva a cabo entre la región C-terminal de la proteína 1a y la N-terminal de la proteína 2a (Suzuki y col., 2003) y es específica de especie, no pudiéndose intercambiar con las de otros virus de organización genética similar como BMV o siquiera, con las de PSV o TAV (Dinant y col., 1993; Masuta y col., 1998; O'Reilly y col., 1997; Traynor y Ahlquist, 1990).

La proteína 1a también está involucrada en la replicación de los RNAs satélites, de forma que ciertas sustituciones aminoacídicas en el dominio helicasa determinan la

replicabilidad de éstos por el virus ayudante (Roossinck y col., 1997). Al igual que en CMV, la capacidad para replicar los RNAs satélites asociados a PSV estriba en el RNA 1 (Hu y col., 1998).

Además de su función en la replicación, la proteína 1a está involucrada en el movimiento viral (Canto y Palukaitis, 1998; 2001; Gal-On y col., 1994). Finalmente, la proteína 2a es la inductora de la resistencia en la planta de *Vigna sinensis* (Kim y Palukaitis, 1997).

1.1.6.2.- Proteína 2b

Es la última proteína de CMV que ha sido identificada (Ding y col., 1994) y su presencia en el genoma ha sido determinante para la clasificación de bromo- y cucumovirus como dos géneros diferentes.

A diferencia de otras proteínas virales se localiza en el núcleo de las células infectadas (Mayers y col., 2000), localización requerida para su actividad como proteína supresora de PTGS (Lucy y col., 2000).

Aunque inicialmente fue considerada como un factor involucrado en el movimiento a larga distancia viral (Ding y col., 1995a), análisis posteriores determinaron que corresponde a un factor de virulencia que interfiere con el mecanismo de defensa denominado silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) y con la del ácido salicílico (Brigneti y col., 1998; Guo y Ding, 2002; Ji y Ding., 2001). También afecta a la replicación viral y facilita el movimiento célula a célula de virus pseudorecombinantes (Ding y col., 1995b; Shi y col., 2003), posiblemente como consecuencia de su capacidad para interferir con dichos mecanismos del huésped.

1.1.6.3.- Proteína 3a o de movimiento (MP)

La MP de CMV se sintetiza en los estadios iniciales de la infección de forma transitoria (Vaquero y col., 1996) y no es necesaria para la replicación viral aunque, su presencia favorece el proceso (Nitta y col., 1988).

Está implicada en los movimientos de célula a célula y larga distancia viral. Reúne las características típicas de las MP virales, es decir, se localiza en la pared celular, se une al RNA viral e incrementa el tamaño de poro (SEL) de los plasmodesmos (Canto y col., 1997; Cooper y Dodds, 1995; Ding y col., 1995a,b ; Kaplan y col., 1995; 1997; Li y col., 2001; Li y Palukaitis, 1996; Sanz y col., 2000; Takeshita y col., 2001; Vaquero y col., 1994; 1996).

La MP se localiza en la pared celular de plantas infectadas y de plantas transgénicas de tabaco que la expresan constitutivamente (Cooper y Dodds, 1995; Vaquero 1994; 1996).

Además, cuando se expresa transgénicamente en plantas de tabaco, también incrementa el SEL de los plasmodesmos (Vaquero y col., 1994) y complementa *in trans* el movimiento de mutantes de CMV defectivos en el movimiento (Cooper y col., 1996; Kaplan y col., 1995; Sanz y col., 2000).

También se ha establecido que es capaz de translocarse de célula a célula a sí misma y a RNA de CMV a través de células del mesófilo (Ding y col., 1995b), si bien estos datos experimentales no parecen reflejar lo que ocurre en el proceso de la infección puesto que, para que tenga lugar el movimiento por los plasmodesmos se requiere el concurso de la CP así como de otros elementos virales (Canto y col., 1997).

A pesar de las diferentes funciones que desempeña, hasta el momento no se ha identificado ningún dominio específicamente asociado a las mismas, a excepción de la región comprendida entre los aa 174 y 233, que es capaz de unirse a ssRNA en ausencia de otras regiones de la proteína a pesar de que no contiene ninguna secuencia consenso de unión a RNA (Vaquero y col., 1996). Sin embargo, para que ésta tenga lugar, la proteína requiere una configuración determinada ya que, la proteína p3a delecionada entre los aa 118 y 160 no puede unir dicho RNA (You y col., 1999).

In vitro se fosforila con GTP y débilmente con UTP (Li y Palukaitis, 1996). En plantas de tabaco que la expresan transgénicamente ésta ocurre en el aa serina, aunque se desconoce la posición y la enzima del huésped responsable (Matsushita y col., 2002a).

Además de su función en el movimiento por los plasmodesmos, es necesaria para la translocación viral a través del floema (Gal-On y col., 1996; Kaplan y col., 1997).

Finalmente, una reducida acumulación de la MP provoca una atenuación de los síntomas y un retraso tanto en el tiempo de formación de los mismos como en la posición de las hojas que los desarrollan (Moreno y col., 1997; Sanz y col., 2000).

1.1.6.3.- Proteína de cubierta (CP)

La CP, además de su función estructural y de unión a ácidos nucleicos, está implicada en el movimiento viral célula a célula (Canto y col., 1997; Kaplan y col., 1998; Schmitz y Rao 1998; Suzuki y col., 1991; Wong y col., 1999), a larga distancia vía floema (Suzuki y col., 1995; Taliansky y Garcia-Arenal, 1995) y en la transmisión por

pulgonos (Palukaitis y col., 1992; Perry y Francki, 1992). También afecta a los procesos de replicación y/o acumulación de los RNAs, de forma que en su ausencia los RNAs de CMV se acumulan pobremente en protoplastos, esencialmente el RNA 3 (Boccard y Baulcombe, 1993; Suzuki y col., 1991).

La estructura de la CP de CMV ha sido resuelta cristalográficamente a 3,2 Å (Smith y col., 2000), lo que ha permitido establecer modelos para resolver la interacción entre las distintas subunidades en el virión, explicar la transmisibilidad de las cepas de CMV por pulgonos, los sitios de interacción con elementos del huésped y los determinantes para su patogenicidad.

La transmisión por pulgonos no requiere otros factores virales a excepción de la CP (Pirone y Megahed, 1966), aunque se desconocen el mecanismo exacto y los posibles ligandos en el vector. No obstante, la reciente resolución cristalográfica de la CP de CMV-Fny (Smith y col., 2000) ha permitido adscribir a ciertos dominios estructurales la capacidad de transmisión. Así, existe una correlación directa entre estabilidad del virión y transmisibilidad (Ng y col., 2000), lo que explicaría el que la transmisión se vea afectada por mutaciones situadas a lo largo de la CP (Perry y col., 1998). Además, se ha identificado un dominio cargado negativamente y situado en las posiciones 191-197 de CMV-Fny que formaría una horquilla situada entre dos láminas β (H e I), expuesta en la superficie de la proteína (Bowman y col., 2002; Liu y col., 2002), que es esencial para la transmisibilidad del virión. Mutaciones en esta región provocan alteraciones fenotípicas en tabaco, lo que demuestra la importancia funcional de este dominio que se encuentra conservado en las CPs de los otros cucumovirus TAV y PSV (Liu y col., 2002).

Asimismo, la CP de CMV contiene determinantes para la sintomatología, tales como la inducción de un mosaico amarillo en plantas de tabaco por CMV-Y y CMV-M (Takahashi y Ehara, 1993; Shintaku y col., 1992), necrosis en vena con quimeras entre las cepas Y, M y O (Suzuki y col., 1995) o enanismo de *N. glutinosa* por CMV-R (Szilassy y col., 1999). En este caso se ha demostrado que la producción de síntomas requiere la interacción específica con otros componentes de CMV ya que, la expresión heteróloga en PVX no produce tales síntomas (Szilassy y col., 1999).

Por otro lado, se ha identificado como el inductor de la HR en plantas de *L. siceraria* (calabaza de peregrino) (Takeshita y col., 2001) y de *A. thaliana* (Takahashi y col., 2001).

Por todo ello, la CP se le define claramente como un factor de patogenicidad viral y determinante de la gama de huéspedes.

1.2.- Replicación viral

Los virus de plantas son dependientes de las actividades metabólicas y de factores de la célula huésped para llevar a cabo los distintos procesos de la replicación.

El mecanismo de replicación de CMV es similar al de otros virus de plantas o animales que tienen como material genético RNA (Buck, 1996; Lai, 1998). Una vez que se produce la entrada del virus en la célula, las partículas virales se desensamblan liberando los RNAs. En la actualidad, se desconoce como ocurre este proceso para CMV y, si al igual que en TMV, intervienen los ribosomas en lo que se conoce como desnudamiento cotraduccional (Hull, 2002). En el caso de CMV, los RNAs 1 y 2 tienen que ser traducidos para dar lugar a las proteínas necesarias para la amplificación del virus y que forman parte del complejo de replicación viral -constituido por las proteínas 1a y 2a del virus y al menos, por una proteína del huésped (Hayes y Buck., 1990)-. La replicación de CMV tiene lugar en membranas (Díaz-Ruiz y col., 1987), asociada a los tonoplastos, donde se colocan las proteínas 1a y 2a (Cillo y col., 2002; Hatta y Franki, 1981). La replicasa viral de CMV reconoce y se une a la región 3' no codificadora común de los RNA virales para dar lugar al complejo de replicación (Palukaitis y col., 1992; Sivakumaran y col., 2000). Asimismo, se han identificado las secuencias del promotor de la síntesis de los RNAs subgenómicos (Boccard y Baulcombe, 1993; Chen y col., 2000). Sin embargo, la participación de la región 5' terminal de los RNAs de CMV en la síntesis del RNA por la replicasa viral o en su reconocimiento aún no está esclarecida (Tayon y col., 2001). Los mecanismos que regulan los niveles de acumulación de cada RNA y el balance entre la replicación y traducción/encapsidación son desconocidos (Lai, 1998; Sullivan y Ahlquist, 1997). Muchas cepas de CMV soportan la replicación de un RNA satélite, lo que indica que éstos han de poseer secuencias de reconocimiento para el complejo de replicación (Roossinck y col., 1992). Sin embargo, hasta la fecha no han sido identificadas, a pesar de que se ha demostrado, *in vitro*, la replicación completa y específica de un RNA satélite de 334 nt por el complejo de replicación (Hayes y col., 1992).

A diferencia de BMV, el conocimiento que poseemos sobre la replicación de CMV es muy limitado. Es posible que el proceso sea muy similar, dada la identidad de

organización genética y la similitud de las secuencias entre ambos. Los trabajos seminales del grupo del Dr Ahlquist, donde han logrado obtener replicones virales en un sistema de levaduras, han permitido diseccionar el proceso de la replicación e identificar una serie de factores del huésped requeridos para la misma.

Al igual que CMV, el genoma de BMV se encuentra segmentado en tres moléculas de RNA de polaridad positiva. Los RNAs 1 y 2 codifican funciones *in trans* requeridas para la replicación del RNA y pueden replicarse independientemente del RNA 3 como ocurre en CMV. Los RNAs 1 y 2 codifican para las proteínas 1a y 2a, respectivamente, y ambas se han encontrado en preparaciones de la replicasa de plantas infectadas con BMV. La proteína 1a posee dominios de metiltransferasa y helicasa y la proteína 2a posee un dominio de polimerasa (Sullivan y Ahlquist, 1997).

Hasta la fecha se sabe que, antes de la síntesis de las cadenas negativas, la proteína 1a de BMV se localiza en las membranas del RE y recluta a los RNAs virales y a la proteína 1a, requiriéndose las regiones 5'-NC de los RNAs 1 y 2 y la región intercistronica del RNA 3 (Chen y col., 2001; Sullivan y Ahlquist, 1997). El reclutamiento de la proteína 2a durante su traducción se realiza a través de la interacción de las proteínas 1a, y la región N terminal del polipéptido naciente (Chen y col., 2003). De esta forma, el complejo replicativo viral queda confinado en esférulas dentro de la célula. En éstas se produce la síntesis de los RNAs virales de cadena negativa, que servirán de molde para la síntesis de la progenie de RNAs genómicos y subgenómicos de polaridad positiva, que a su vez servirán para la traducción de las proteínas estructurales y no estructurales. Para que este proceso tenga lugar se requiere una proteína denominada Lsm1p implicada en la deacilación de mRNAs y que participa específicamente en la rápida traducción de los RNAs genómicos, seleccionándolos para su reclutamiento y replicación (Noueiry y col., 2003). También se requiere una desaturasa de ácidos grasos (Lee y col., 2001), lo que indica que se requiere una composición lipídica especial en la célula, y una proteína similar a DnaJ, que ayuda a las chaperonas Hsp70 y Hs90 en el plegamiento de proteínas, translocación a través de membranas, ensamblaje de complejos macromoleculares y degradación proteica (Tomita y col., 2003). La identificación de estos factores pone de manifiesto la complejidad del proceso, así como la estricta regulación a la que está sometido.

1.3.- Movimiento viral: célula a célula y larga distancia

La invasión del huésped conlleva la ejecución de dos tipos de movimientos por parte del agente infeccioso que dan lugar a la dispersión del mismo por toda la planta. Tradicionalmente, se han denominado: movimiento célula a célula o a corta distancia y movimiento sistémico o a larga distancia que se llevan a cabo a través de los plasmodesmos y floema, respectivamente. El primero es un movimiento lento, mientras que el segundo es rápido y permite al virus invadir lugares alejados de donde se produjo la infección. De esta forma, los virus utilizan las rutas de comunicación intercelular existentes en las plantas y requieren el concurso de elementos virales específicos denominados proteínas de movimiento (MP). En la mayoría de los casos, estas proteínas están codificadas por un único gen, aunque puede estar codificada por tres –bloque de genes triple (TGB)- (Morozov y Solovyev, 2003) e incluso, en el caso de los closterovirus (Alzhanova y col., 2000), está codificada por cinco genes. Mutaciones en estas proteínas dan lugar a virus que no se pueden mover de célula a célula, pero que son capaces de replicarse en células individuales (Carrington y col., 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999; Lucas, y Wolf, 1999; Oparka y Santa Cruz, 2000). Una de las características de las MPs es que son funcionalmente homólogas, de forma que pueden suministrar la función de movimiento a virus distanciados filogenéticamente con organizaciones genéticas diferentes, lo que sugiere que virus de distintos grupos comparten un mismo mecanismo de movimiento (Carrington y col., 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999). A diferencia de otras proteínas virales, como las que forman parte de la RdRp, no ha sido posible encontrar en su estructura primaria ninguna región conservada, por lo que se postula que la función de estas proteínas está estrechamente relacionada con su estructura tridimensional (Melcher, 1990; 2000; Mushegian y Koonin, 1993).

Los plasmodesmos son conexiones citoplasmáticas intercelulares que suponen una continuidad simplástica en las plantas. Está ampliamente aceptado que estas estructuras desempeñan una función esencial para coordinar la fisiología y el desarrollo, permitiendo el paso de macromoléculas: nutrientes, proteínas y elementos reguladores (factores de transcripción, hormonas...), y su funcionamiento está estrictamente regulado (Haywood y col., 2002; Mezzit y Lucas, 1996; Zambryski y Crawford, 2000).

A pesar del enorme esfuerzo dedicado a su estudio, la complejidad estructural y funcional de los plasmodesmos así como de sus conexiones citoplasmáticas, han

limitado considerablemente su análisis, de forma que los datos que actualmente poseemos sobre su composición y estructura son muy limitados (Escobar y col., 2003; Haywood y col., 2002; Zambryski y Crawford, 2000). Al microscopio electrónico, se observan como discontinuidades en la pared celular que están atravesadas por prolongaciones del retículo endoplasmático, denominado desmotúbulo, delimitadas por la membrana plásmica. El transporte tiene lugar entre los canales citoplasmáticos situados entre la membrana plasmática y la cara externa del RE, denominado manguito citoplasmático (cytoplasmic sleeve). En éste se observan partículas globulares y alargadas de naturaleza proteica, que deben contribuir a regular el paso a través de ellas. Entre otros, se han identificado elementos del citoesqueleto que podrían dirigir y llevar a las macromoléculas hacia los plasmodesmos y ejercer una función reguladora de apertura y cierre de los mismos para permitir el paso selectivo de macromoléculas (Aaziz y col., 2001, Ding, 1998; Haywood y col., 2002; Overall y Blackman, 1996; Zambryski y Crawford, 2000).

La regulación del límite de exclusión molecular (SEL) de los plasmodesmos es mucho más complejo de lo que inicialmente se pensaba. El SEL varía de unas células a otras y está relacionado tanto con la arquitectura –sencilla o ramificada– como con el tipo celular o las condiciones medioambientales (Haywood y col., 2002; Oparka y Santa Cruz, 2000; Pickard y Beachy, 1999; Zambryski y Crawford, 2000). Así el SEL de las células acompañantes/elementos cribosos es distinto del de las células del mesófilo, y a su vez difiere del de los tejidos meristemáticos (Oparka y Santa Cruz, 2000; Ruiz-Medrano y col., 2001; Zambryski y Crawford, 2000).

Para soslayar las limitaciones impuestas del SEL de los plasmodesmos al paso de la unidad infecciosa viral, las MPs virales poseen la capacidad de aumentarlo (Oparka y Santa Cruz, 2000; Lazarowitz y Beachy, 1999).

1.3.1.- Movimiento de célula a célula

Este tipo de movimiento que también se conoce como movimiento a corta distancia o movimiento local, abarca la expansión viral antes de llegar al sistema conductor, desde los lugares de entrada al huésped, las células epidérmicas y del mesófilo hasta las células de la túnica. A partir de este punto se produce la entrada en el sistema vascular, y por tanto, se podría hablar de movimiento a larga distancia cuando la infección se expande desde las células de la túnica, a través de las células del parénquima vascular (PPs) y/o células acompañantes (CCs), hasta los elementos

cribosos (SEs) y de ahí, a otras regiones de la planta (Carrington y col., 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999; Oparka y Santa Cruz, 2000).

Se han identificado diferentes modelos de movimiento para los genomas virales (Carrington y col., 1996; Gilbertson y Lucas, 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999). Para simplificar su descripción se suelen distinguir dos modelos, dependiendo de que el transporte se realice a través de plasmodesmos modificados permanentemente o no. En el primer caso, tipificado por los comovirus, el movimiento se lleva a cabo en forma de viriones a través de túbulos, en cuya formación participa la MP. En el segundo, el sistema modelo mejor estudiado corresponde al de TMV donde la unidad infecciosa viral es una ribonucleoproteína.

La ausencia de viriones de CMV en los plasmodesmos, así como la acumulación de la proteína p3a en los plasmodesmos no modificados de células infectadas de distintos huéspedes indican que el transporte de CMV sigue el modelo de TMV (Blackman y col., 1998; Vaquero y col., 1996).

Como en el proceso de replicación, nuestro conocimiento sobre el movimiento de CMV intra y extracelular es muy limitado. Una de las mayores limitaciones viene impuesta por la inestabilidad de virus quimeras con moléculas deladoras, lo que ha impedido obtener un buen sistema de análisis. No obstante, se sabe que para que el movimiento tenga lugar es necesita la CP además de la proteína p3a, si bien en ausencia de ésta se puede producir la traslocación viral por las células del mesofilo cuando la MP procede del tombusvirus heterólogo CyRSV (Huppert y col., 2002). La función de la CP en este movimiento no está dilucidada. Por un lado, la proteína p3a puede unirse al RNA de una forma cooperativa, similar a la de la proteína 30K de TMV; lo cual podría indicar que el movimiento del RNA viral se hace en forma de complejo ribonucleoproteico siguiendo el modelo propuesto para TMV (Tzfira y col., 2000). Sin embargo, TMV no requiere la CP para el movimiento a corta distancia, lo que a su vez indicaría que, a pesar de que el patrón general de movimiento es similar, existen diferencias significativas entre una y otra proteína. Por otro lado, los trabajos de Canto y col. (1997), Kaplan y col. (1998) y Schmitz y Rao, (1998), pusieron de manifiesto que el movimiento a través de los plasmodesmos requiere una CP, aunque no sea funcional para la encapsidación, lo que indica que no se realiza en forma viriones. Finalmente, Nagano y col. (1997; 1999) demostraron que los últimos 33 aa de la región C-terminal de la MP son determinantes para el requerimiento de la CP homóloga, de forma que virus BMV quimeras –cuya MP había sido sustituida por una MP de CMV con esta región

deleccionada- eran funcionales para el movimiento, aunque con menor eficiencia, mientras que los virus BMV quimera que contenían la p3a de CMV intacta no. Sin embargo, se desconoce si las interacciones entre ambas proteínas es directa, o indirecta a través de algún componente del huésped. De hecho, con las limitaciones impuestas con la técnica del doble híbrido, O'Reilly y col. (1997) no pudieron detectar interacciones entre la proteína p3a o p3a-CP de BMV, virus cuyo requerimiento para el movimiento son similares a los de CMV. Este hecho podría indicar que estas interacciones requieren el concurso de otros elementos del virus o de la planta.

Como mencionábamos anteriormente, la proteína p3a se fosforila *in vitro* e *in vivo* en plantas transgénicas (Li y Palukaitis, 1996; Matsushita y col., 2002). Su significado biológico se desconoce. Los estudios llevados a cabo con las MPs de TMV y ToMV indican que la fosforilación es requerida para su adecuado funcionamiento y localización celular, contribuyendo a su estabilidad. No obstante, en algunos casos parece no ser indispensable, por lo que para algunos autores sería una forma de inactivar la proteína mientras que, para otros, sería requerida para regular el proceso del transporte intra- e intercelular que requiere energía (Kawakami y col., 2003; Kragler y col., 2003; Lee y Lucas, 2001; Pickard y Beachy, 1999; Zambryski y Crawford, 2000). Finalmente, en el caso de CMV se desconoce si las proteínas involucradas en la replicación son necesarias para el movimiento viral como ocurre en TMV, donde se requiere el dominio helicasa de la polimerasa para el movimiento intra- e intercelular (Hiroshima y Watanabe, 2001).

Para CMV, no se poseen datos sobre el movimiento intracelular de los complejos replicativos desde los lugares de replicación a los plasmodesmos ni sobre la contribución de la proteína p3a en este proceso. Por similitud con TMV, virus cuya traslocación intercelular es más conocida y cuya MP fue la primera proteína viral a la que se le asignó una función específica en el movimiento del virus (Deom y col., 1987; Meshi y col., 1987), todos los datos apuntan a que las MPs favorecen la redistribución del complejo de replicación –asociado a RE- mediante la asociación al citoesqueleto (Aaziz y col., 2001; Reichel y Beachy, 1999)-. Si bien para algunos autores se realiza por los microtúbulos en asociación a la tubulina (Beachy y Heinlein, 2000), para otros, la redistribución se realiza por interacción con la actina del citoesqueleto (Ding, 1996; Gillespie y col., 2002) y la interacción con los microtúbulos representaría la vía de traslocación para su degradación mediante el proteosoma 26S (Mas y Beachy, 1999;

Reichel y Beachy, 2000), sistema que también parece estar involucrado en la degradación de la MP de TYMV (Drugeon y Jupin, 2002).

1.3.2.-Movimiento a larga distancia

Este tipo de movimiento comprende la expansión del agente infeccioso a través del floema siguiendo la ruta fuente-sumidero de translocación de fotoasimilados. Así, en primer lugar, encuentra una ruta descendente por el floema externo desde la hoja inoculada hasta el tallo, posteriormente entra en el floema interno y rápidamente sufre un transporte ascendente a los tejidos jóvenes de la planta (Leisner y Turgeon, 1993; Lucas y Wolf, 1999; Nelson y van Bel, 1998).

La complejidad de los tipos celulares y de sus conexiones, así como la influencia de la replicación y del movimiento célula a célula en el movimiento del virus a larga distancia, complican el análisis del mismo.

Los requerimientos genéticos para el movimiento a larga distancia viral son diferentes para los distintos virus de plantas. Así, mientras que CMV, al igual que TMV, requiere la MP y la CP, otros virus de plantas necesitan un factor especializado para este tipo de movimiento (LTF), el componente helper (Carrington y col., 1996) en el caso de los potyvirus, o en el caso de los closterovirus dos LTF: p-20, proteína especializada en esta función, y L-Pro, proteinasa L, también implicada en el procesamiento proteolítico de la poliproteína y en la amplificación genética (Peng y col., 2003; Prokhnevsky y col., 2002). El tipo de interacción requerida no se conoce. No obstante, de los datos de complementación heteróloga en los virus quimeras entre el bromovirus CCMV, que contienen la MP del tobamovirus ORSV, indican que estas interacciones no son específicas de secuencia (De Jong y col., 1997).

En la MP de CMV, y mediante la caracterización de cepas y/o mutantes que poseían movimientos sistémicos defectuosos en distintos huéspedes (tabaco, y calabaza), se ha determinado que eran debidas a alteraciones situadas a lo largo de la proteína p3a (Gal On y col., 1996; Kaplan y col., 1997; Li y col., 2001). Sin embargo, en ausencia de un modelo estructural de la proteína, se desconoce si los cambios afectan directamente a los lugares activos de ésta o alteran a la estructura de la proteína y consiguientemente la funcionalidad. Como indicábamos anteriormente, también se requiere la CP (Suzuki y col., 1995; Talianky y García-Arenal, 1995; Thompson y García-Arenal, 1998), y se postula que el movimiento sistémico se realiza en forma de viriones. Blackman y col. (1998) han propuesto un modelo –a partir de la

visualización de la MP y CP mediante microscopía electrónica- que integra los dos movimientos de CMV: el complejo ribonucleoproteico atravesaría los plasmodesmos de las células del mesófilo y el sistema vascular hasta llegar a los elementos cribosos de las venas menores, donde se produciría una acumulación muy de la proteína p3a, se ensamblarían las partículas virales, y posteriormente tendría lugar el movimiento por el floema con el flujo de fotosintato.

El movimiento en forma de virión parece ser la forma general que utilizan los virus para su traslocación, posiblemente para mantener su integridad (Carrington y col., 1996; Hull, 2002; Nelson y Van Bel, 1998). Algunos agentes infecciosos, como viroides o los umbravirus que no codifican para una CP, se mueven a larga distancia a través del floema. Para ello utilizan proteínas del huésped (Gomez y Pallás, 2001; Owens y col., 2001) u otras proteínas virales cuya función sería la de proteger a los RNAs, tal y como ha sido demostrado al sustituir en el genoma de TMV la CP por la ORF3 del umbravirus GRV (virus de la roseta del cacahuete), y en lugar de formarse viriones, se forman ribonucleoproteínas filamentosas que se mueven como tales (Ryabov y col., 1999a; Taliansky y col., 2003).

Además de su función en la encapsidación, y por consiguiente para el movimiento por el floema, la proteína CP de CMV y de TAV, se requiere para la entrada de la infección al sistema vascular desde las células de la túnica (Ryabov y col., 1999b; Thompson y García Arenal, 1998). Este sitio funciona como un puesto de control para muchas de las infecciones virales donde actúan diversas resistencias, ya sean naturales o introducidas, como en las plantas resistentes a CMV que expresan formas truncadas de la proteína 2a (Wintermantel y col., 1997). Se postula que una de las razones que impiden a los virus atravesar esta barrera, a parte de los requerimientos fisiológicos propios de estas células como la diferencia del SEL de los plasmodesmos, sería la interferencia ejercida por mecanismos de defensa de la planta que podrían interferir con el movimiento viral (Nelson y van Bel, 1998). En este sentido, el hecho de que la producción de la forma activa de la sistemina, polipéptido implicado en la señalización de la respuesta a herida, se produce precisamente en las células acompañantes, podría indicar que estas células, además de regular el transporte por el floema, participan de forma activa en la defensa de la planta (Ruiz-Medrano y col., 2001; Ryan y Pearce, 2003).

Además de las proteínas p3a y CP, los RNAs 1 y 2 y/o sus productos están involucrados en el movimiento a larga distancia en plantas de tabaco y de rábano

(Canto y Palukaitis, 1998; 2001; Gal On y col., 1994; Roossinck y Palukaitis, 1990; Takeshita y col., 1998). También han sido descritos requerimientos de elementos del complejo de replicación viral en otros virus de plantas como TMV (Nelson y Van Bel, 1998) y, en general no se asocian a los procesos de replicación. Se postula que tienen una función específica en el movimiento, aunque su implicación en otros procesos tales como la activación de mecanismos de defensa del huésped no quedan descartados.

1.3.3.- Factores del huésped implicados en el movimiento viral

El hecho de que un mismo virus pueda establecer una infección generalizada en un huésped pero, en otros, no pueda desempeñar los movimientos a corta y/o larga distancia, indica que los elementos del huésped son necesarios para que se lleven a cabo ambos procesos y que a su vez, son diferentes para cada uno de ellos. En los últimos años, se le está prestando una enorme atención a la identificación de estos factores. El empleo de diversas técnicas para analizar interacciones proteína-proteína y el uso de cv. de *A. thaliana* con distintas capacidades para soportar los movimientos a corta o larga distancia viral, ha permitido el aislamiento -en ensayos in vitro o en levadura- de una serie de elementos del huésped que interaccionan con las MPs. Sin embargo, los datos son puntuales y, en general limitados a un sistema modelo virus-huésped.

Se han identificado distintos factores de transcripción que interaccionan con la MP de ToMV pero no con la de CMV (Matsushita y col., 2002b), con la de TBSV (Desvoves y col., 2002), o con la de CaMV (Huang y col., 2001). Otros factores que pueden corresponder, en mayor o menor grado, a los necesarios para que se lleve a cabo el transporte viral serían: una proteína semejante a integrina, que interacciona con la MP de TCV (Lin y Heaton, 2001) y que pudiera servir de unión al citoesqueleto y la proteína de la pared pectin-metilesterasa, cuya interacción con la proteína 30K de TMV llevó a proponer que pudiera servir de receptor para las MPs al ser capaz de interaccionar con las MPs del tobamovirus TVCV y del caulimovirus CaMV -que es un virus con genoma DNA- (Chen y col., 2000; Dorokhov y col., 1999). Sin embargo, estos resultados no pudieron ser corroborados con la proteína P22 de TBSV (Desvoves y col., 2002).

También se han demostrado interacciones entre la 30K de TMV una proteína del RE (Nt-NCPP1, Lee y col. 2003) y otra que interacciona con microtúbulos (MPB2C,

Kragler y col., 2003). Los datos disponibles en estos dos casos apuntan a que ambas podrían ser dianas de la MP de TMV. Asimismo, Fridborg y col. (2003) han detectado que las proteínas del TGB de PVX interaccionan con una proteína HBP1, que podría proporcionar un lugar de unión al RE y con la β 1-3 glucanasa, enzima implicada en la digestión de callosa. La deposición de callosa regula la entrada a los plasmodesmos e interviene tanto en el movimiento a corta distancia como en la descarga del virus desde el floema (Bucher y col., 2001; Iglesias y Meins, 2000; Ueki y Citovsky, 2002).

Finalmente, la chaperona hsp40, que interacciona con la ribonucleoproteína de TSWV (Soellick y col., 2000), que –al igual que el closterovirus BYV (Alzhanova y col., 2001)- requiere el concurso de una proteína tipo hsp70 (hsp70h) para el movimiento y que proporciona una adecuada reestructuración de las proteínas, podría suministrar ATP necesario para que se lleve a cabo la translocación del virus.

1.4.- Mecanismos de resistencia en plantas

Como mencionábamos anteriormente, para que el virus pueda realizar los distintos procesos que constituyen su ciclo de infección necesita el concurso de factores del huésped. Si éstos no pueden llevar a cabo las interacciones apropiadas con los factores del virus o la planta carece de ellos, el individuo será inmune a la infección siempre que se trate de factores requeridos para la replicación y/o traducción. Tal es el caso del factor de iniciación de la traducción 4E e iso4E que requieren los potyvirus en *A. thaliana* y pimiento (Duprat y col., 2002; Ruffel y col., 2002) y de distintos genes de este huésped que son requeridos para la replicación de los tobamovirus (Lellis y col., 2002; Tsujimoto y col., 2003; Yamanaka y col., 2000; 2002). La infección quedará limitada a los lugares primarios de infección, si los factores del huésped son requeridos para el movimiento viral, como es el caso de los genes RTM1 y RTM2 a TEV en *A. thaliana* que impiden el movimiento a larga distancia viral (Chisholm y col., 2000; Whitham y col., 2000). Dawson y Hilf (1992) apuntan que la inmunidad a las infecciones virales ocurre en más del 90% de las combinaciones posibles entre especies vegetales-virus de plantas. Además, las plantas a lo largo de la evolución han desarrollado una serie de mecanismos para contrarrestar, retrasar o incluso suprimir las infecciones virales. Tradicionalmente estos mecanismos de defensa se han clasificado en: constitutivos e inducidos. Cuando se habla en estos términos, se considera que la inmunidad representa la expresión de la resistencia constitutiva. En contraposición, los mecanismos inducidos se activan tras la percepción del patógeno por el huésped y

de ellos se conocen la reacción hipersensible y el silenciamiento génico postranscripcional.

1.4.1.- Reacción hipersensible (HR)

La activación de la HR es un mecanismo de defensa específico frente a la invasión de distintos patógenos ya sean virus, bacterias u hongos. Va acompañada de la activación transcripcional de genes de defensa y de rutas de transducción de señales que conllevan a la muerte celular programada y al confinamiento del patógeno a los lugares de infección primaria. Se manifiesta en la formación de lesiones locales necróticas. Las bacterias y los hongos quedan localizados dentro de la zona necrótica y los virus en la región clorótica que la rodea (Dong, 1998; Goodman y Novacky, 1994; Hull, 2002; Klement, 1982). Además, produce la inducción de una respuesta de defensa sistémica (SAR), confiriendo al huésped resistencia frente a posteriores ataques de patógenos. Esta reacción es activa no sólo frente al patógeno inductor sino también frente a patógenos de distinta naturaleza, incluyendo virus (Murphy y col., 1999; Ryals y col., 1996).

Para que se desencadene la HR la planta requiere poseer un gen de resistencia R y el patógeno el correspondiente gen de avirulencia Avr o inductor de la resistencia (Flor, 1971). La percepción directa o indirecta del inductor por el producto del gen R activa dicha respuesta (Gabriel y Rolfe 1990; Hammond-Kosack and Parker, 2003; Keen 1990; Mackey y col., 2003; Van der Biezen and Jones, 1998). Trabajos recientes han demostrado que el reconocimiento de los factores inductores y la consiguiente activación de la reacción de defensa es un proceso más general de lo esperado, de forma que la resistencia extrema que se observa en ciertas interacciones virus-huésped, que habían sido descritos como una forma de inmunidad -como la conferida por los genes Rx o Ry frente a los virus X e Y de la patata-, es debida a la activación de un mecanismo de defensa del tipo HR, pero de tal intensidad o velocidad que es capaz de inhibir la replicación del virus en los protoplastos de las plantas resistentes sin resultar en la muerte celular programada (Bendahmane y col., 1999; Mestre y col., 2000).

Hasta el momento se han aislado cinco genes R de plantas que confieren resistencia frente a distintos virus: el gen N de tabaco que confiere resistencia a los tobamovirus (Whitham y col., 1996), el gen Rx de patata frente a PVX (Bendahmane y col., 1999) y los genes de *A. thaliana*: RCY1 frente a CMV (Takahashi y col., 2002), HRT

frente a TCV (Cooley y col., 2000; Kachroo y col., 2000), y el gen Sw-5 de tomate frente a TSWV (Brommonschenkel y col., 2000).

Desde el lado del virus, se le ha prestado un gran interés tanto a la identificación de estos inductores como a establecer las diferencias entre las cepas inductoras y no inductoras que llevan a sortear las resistencias. Así, se ha podido determinar que cualquier gen viral puede actuar como inductor en su correspondiente sistema de incompatibilidad (Hull, 2002). En el caso de CMV, la proteína 2a es el inductor de la resistencia en las plantas de *Vigna sinensis* (Kim y Palukaitis, 1997) y la CP, de la resistencia conferida por el gen RCY en *A. thaliana* (Takahashi y col., 2001).

1.4.2.- Silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS)

Participa tanto en los mecanismos de defensa frente a virus de plantas y animales como en la protección del genoma y en la regulación de la expresión de genes. Consiste en la degradación de RNA, específico de secuencia y dirigido por RNA. Es activo en hongos, animales y plantas. Su activación requiere la presencia de dsRNAs, que se sintetizan por RdRps del huésped, o en el caso de los virus RNAs, por la RdRp viral. Los dsRNAs inductores son procesados en pequeños RNAs de 21 a 25 nt, que se asocian al denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), y actúan como guías para la degradación específica de los correspondientes RNAs (Bartel and Bartel, 2003; Baulcombe, 2002). Una vez inducido el silenciamiento en las plantas se expande local y sistémicamente, utilizando posiblemente las mismas vías que los virus: plasmodesmos y floema, aunque se desconoce cuál es la señal (Himber y col., 2003; Mlotshwa y col., 2002).

Desde el punto de vista de la interacción huésped-virus, representa la forma más eficaz de resistencia, puesto que conlleva la eliminación del patógeno. Por ello, es razonable que los virus a lo largo de su evolución hayan desarrollado mecanismos para soslayar el PTGS. Ésta sería la razón por la que diversos factores virales actúan como "supresores" de esta respuesta, a pesar de que sus funciones en el ciclo biológico viral son muy diversas y sus secuencias muy divergentes (Baulcombe, 2002; Carrington y col., 2001; Voinnet, 2001; Waterhouse y col., 2001a). Los supresores virales actúan en distintos puntos del proceso y el análisis de sus mecanismos de acción está contribuyendo enormemente a desvelar la complejidad del mismo, pero se desconocen sus efectores. Así por ejemplo, la CP de TCV, la p19 de TBSV y posiblemente la proteína 2b de CMV, inhiben distintas fases del proceso de iniciación;

la HC de los potyvirus, las proteínas NS de tospovirus y tenuivirus, la P15 del pecluvirus PCV y la P0 del polerovirus BWYV interfieren con el mantenimiento, y las proteínas p25 de PVX y 2b de CMV interfieren con la señalización del proceso, y consiguiente movimiento a larga distancia (Bucher y col., 2003; Carrington y col., 2001; Ding, 2002; Dunoyer y col., 2002; Guo y Pfeffer y col., 2002; Qu y col., 2003; Thomas y col., 2003; Waterhouse y col., 2001a).

El silenciamiento del RNA mediado por virus de plantas, también denominado VIGS (VPTGS) se activa tras la infección, y los nuevos datos que surgen indican –al igual que ocurría con la HR– que es un mecanismo de defensa operativo en muchas interacciones huésped-patógeno. Así, es posible que algunas de las limitaciones de la infección viral que parecían ser debidas a inhibiciones con el proceso de movimiento podrían ocurrir por la activación de este mecanismo, según se infiere de los estudios llevados a cabo con la proteína 2b de CMV, que había sido descrita como un factor requerido para el transporte a larga distancia viral, y posteriormente se demostró que era un factor supresor de PTGS (Ding y col., 1995a; Brigneti y col., 1998). Además, es probable que el fenómeno de protección cruzada –consistente en que plantas previamente inoculadas con una cepa atenuada son resistentes a la superinfección con cepas virulentas estrechamente relacionadas– sea debido precisamente a PTGS (Baulcombe 2002; Waterhouse y col., 2001a).

1.5.- Control de las enfermedades virales

Las enfermedades virales en plantas tienen una gran repercusión ecológica y económica por todo el planeta al afectar la producción de las cosechas y, por tanto, de la salud humana y animal. En el control de las mismas se encuentran dificultades importantes. Las estrategias son variadas, particularmente en los virus que se transmiten por pulgones. Así, se han empleado: la propagación de plantas libres de virus, erradicación de plantas infectadas, supresión de la actividad del vector y empleo de cultivos resistentes e incluso, la inoculación de los cultivos con cepas atenuadas para evitar la posterior colonización por cepas más virulentas. Sin embargo, CMV no se controla tan eficientemente como otros virus debido a que posee un amplio rango de huéspedes y muchos cultivos y malas hierbas actúan como reservorios. Además, su transmisibilidad por distintas especies de pulgones requiere el uso de insecticidas cuya eficacia es limitada. Por otro lado, muy pocas especies vegetales presentan resistencia genética frente a CMV. A menudo, ésta se traduce en tolerancia al virus y en

ocasiones surgen nuevas cepas que sobrepasan la resistencia. Es por ello por lo que la aplicación de las medidas tradicionales de control de las enfermedades a CMV posee enormes limitaciones. Las formas de control más eficaces son la erradicación de las plantas que actúan como reservorios del virus y el diagnóstico de las semillas y plántulas (Gallitelli, 2000; Palukaitis y col., 1992).

Alternativamente, se han desarrollado estrategias de control no convencionales, basadas en el empleo de técnicas de ingeniería genética, para soslayar las limitaciones de las medidas de control actuales. Dada la importancia económica de las infecciones virales, se han explorado todo tipo de estrategias desde la expresión de anticuerpos dirigidos contra proteínas estructurales o no estructurales, ribozimas, inhibidores naturales de la replicación viral, hasta las proteínas inhibidoras de los ribosomas (PIP) o péptidos (aptámeros), aunque la forma más utilizada ha sido la "resistencia derivada del patógeno" (Golbach y col., 2003; Prins, 2003; Ulhrig, 2003).

El aislamiento de los genes R ha posibilitado la obtención de plantas resistentes en especies distintas de las que se aisló el gen. Sin embargo, en algunos casos no se han podido soslayar las restricciones interespecíficas –una de las mayores limitaciones de los cruces genéticos clásicos- puesto que la respuesta mediada por estos genes requiere factores adicionales del huésped que a su vez han de ser compatibles con el mismo (Ellis y col., 2000; Hammond-Kosack y Parker, 2003; Liu y col., 2002b). Además su eficacia parece depender de su nivel de expresión, como se ha puesto de manifiesto tras la introducción en ecotipos susceptibles de los genes de resistencia RCY y HRT de *A. thaliana* frente a CMV y TCV, respectivamente (Kachroo y col., 2000; Takahashi y col., 2002).

Uno de los sistemas más explorados para el control de las enfermedades virales deriva de la aplicación de la teoría conocida como resistencia derivada del patógeno, propuesta por Sanford y Johnston en 1985. Según ésta, la expresión anómala de factores del patógeno interferiría con su función en el ciclo vital y de esta forma el huésped se haría resistente al mismo. El primer caso de resistencia transgénica derivada del patógeno frente la infección viral, manifestado en un retraso en la aparición de los síntomas y una disminución en la acumulación viral, se obtuvo con la expresión transgénica en plantas de tabaco de la CP de TMV (Powell-Abel y col., 1986). A partir de aquí, se han creado un gran número de plantas transformadas con secuencias virales que abarcan todas las regiones del genoma pertenecientes a casi

todos los grupos taxonómicos (Baulcombe, 1994; 1996; Beachy, 1997; Fitchen y Beachy, 1993; Goldbach y col., 2003; Hull y Davies, 1992; Lomonossoff, 1995; Wilson, 1993).

Esta estrategia se puede dividir grosso modo en dos grupos: las que utilizan la expresión de proteínas (CP, replicasa y MP) y las que expresan RNAs no codificadores (RNA sentido, antisentido, dsRNA).

1.5.1.- Resistencia mediada por la CP

Los trabajos pioneros de Powell-Abel y col. sentaron las bases para la utilización de la expresión de la CP como sistema de control de las enfermedades producidas por virus de prácticamente todos los grupos taxonómicos (Beachy, 1997; Goldbach y col., 2003; Lomonossoff, 1995). En el caso concreto de CMV, las proteínas de cubierta de trece cepas diferentes se han utilizado para la transformación de plantas de tabaco, tomate, sandía, melón y/o calabaza (ref. en Jacquemond y col., 2001) algunas de las cuales están comercializadas, como las plantas de melón que contienen además resistencia a los potyvirus (Lin y col., 2003) y otras en fase de experimentación en el laboratorio o en el campo.

En general, la protección mediada por la CP se suele manifestar en una disminución de los sitios iniciales de infección –con la consiguiente menor acumulación de virus en hojas inoculadas y superiores- y con un retraso y atenuación de los síntomas. A grandes rasgos, las características de esta resistencia son: a) sólo se manifiesta si el inóculo es la partícula viral, b) se sobrepasa al menos parcialmente a medida que aumenta la concentración de inóculo, c) el grado de protección es directamente proporcional al nivel de acumulación de CP y e) la similitud de secuencia del virus desafiante y el transgén (Lomonossoff, 1995). Por tanto, comparte semejanzas con la protección cruzada clásica (Lomonossoff, 1995), fenómeno descrito de forma independiente por MacKinney y col. (1929) y por el que las plantas preinoculadas con un virus son resistentes a la superinfección con virus relacionados.

En plantas transformadas con la CP de CMV, existen casos descritos que corresponden a la típica protección mediada por la CP (Cuzzo y col., 1988). Sin embargo, otros muchos, y como ocurre con otros sistemas, se desvían del comportamiento general. Así, algunas plantas muestran protección cuando el inóculo corresponde tanto a RNA como a viriones mientras que, contradictoriamente, los protoplastos derivados de ellos son sólo resistentes a éstos últimos (Okuno y col., 1993; CMV-Y); en otras, la protección no se relaciona con el nivel de acumulación de la CP

(Namba y col., 1991: CMV-WL; Quemada y col., 1991: CMV-C); la CP de CMV-O, expresada transgénicamente, protege frente al virus del moteado suave del crisantemo, no relacionado serológicamente (Nakajima y col., 1993) y plantas de tabaco transformadas con la CP de CMV-WL (subgrupo II) protegen frente a cepas del subgrupo I (Namba y col., 1991) e inversamente, plantas de calabaza transformadas con la CP de CMV-C (subgrupo I) protegen frente a algunas cepas del subgrupo II, con las que comparten homologías de secuencias aminoacídicas del 80%, pero no frente a cepas del subgrupo I, a pesar de que la homología de secuencia es de un 90%. Estos datos ponen de manifiesto que los mecanismos subyacentes son complejos y en gran parte desconocidos.

Aunque los trabajos iniciales sobre la expresión de la CP de TMV mostraban que la resistencia estaba mediada por la proteína, las resistencias conferidas por las CPs de otros virus pueden estar mediadas por el RNA o por ambos (Tepfer, 2002). En general, los primeros se asocian con los distintos niveles de resistencia, mientras que en el resto se observa una resistencia extrema o inmunidad.

En la resistencia mediada por la proteína y en el sistema mejor estudiado: CP de TMV, los datos apuntan a que se debe a la interferencia con el proceso de desensamblaje cotraduccional de la partícula viral. Además, la CP de TMV al regular la producción de la MP puede interferir con la acumulación de ésta y con el consiguiente movimiento célula a célula (Bendahmane y Beachy, 1999; Bendahmane y col., 2002). En los otros sistemas, incluyendo CMV, los mecanismos son desconocidos y se postula que afectan al desnudamiento-encapsidación, replicación o incluso puedan estar relacionados con las funciones patogénicas de la CP.

En otros casos, la resistencia no es mediada por la CP, sino por el RNA, debido a la activación de PTGS o VIGS. La participación de este mecanismo en la resistencia fue demostrado por primera vez por Lindbo y col., 1993, al observar que la expresión de un gen no traducible de la CP del potyvirus TEV, confería resistencia al mismo. Este tipo de protección también se observó en líneas de plantas en las cuales no se acumulaba o se acumulaba muy poco RNAm, sugiriendo que la resistencia era debida a la degradación del RNAm del transgén y del correspondiente RNA viral. Los análisis posteriores han mostrado que independientemente del nivel de acumulación del transgén viral, la infección puede desencadenar dicha respuesta e inhibir la acumulación de ambos virus y transgén (Baulcombe, 2002; Carrington y col., 2001; Waterhouse y col., 2001a).

A medida que se va avanzando en el conocimiento de los mecanismos básicos de esta resistencia, es mayor el número de casos en el que parece operar ambos tipos de resistencia (Tepfer, 2002). Así por ejemplo, la resistencia conferida por el transgén correspondiente a la nucleocápsida del virus del bronceado del tomate (TSWV) confiere resistencia a este virus mediante PTGS y en menor grado a otros tospovirus, mediante un mecanismo mediado por proteína (Pang y col., 1996). Esto podría ser debido a que la secuencia de la nucleocápsida de otros tospovirus es suficientemente diferente de la del transgén de TSWV, escapando así del PTGS y permitiendo que el mecanismo mediado por la proteína tenga lugar.

1.5.2.- Resistencia mediada por la replicasa

Este tipo de resistencia es mediada por secuencias derivadas de genes implicados en la replicación viral. Los mecanismos responsables de la misma han sido muy estudiados, aunque no completamente dilucidados (Beachy, 1997; Palukaitis y Zaitlin, 1997). El primer caso descrito fue en plantas de tabaco transformadas con la secuencia génica de la proteína 54K de TMV correspondiente al dominio polimerasa de la replicasa viral (Golemboski y col., 1990). Desde entonces, se han usado secuencias génicas diversas que corresponden a las de los genes completos de la replicasa, o secuencias que codifican versiones truncadas o mutadas de la proteína. La resistencia conferida por esta región es muy específica, siendo eficaz sólo frente a cepas estrechamente relacionadas, y activa a dosis muy elevadas de inóculo (Golemboski y col., 1990; Tenllado y col., 1995), lo cual es indicativo de un mecanismo de resistencia mediado por RNA. Por ello, los requerimientos de traducibilidad del transgén es objeto de debate (Baulcombe, 1996; Bendahmane y Beachy, 1999). Así, mientras que la resistencia conferida por esta región frente a TMV y el virus del amarronamiento del guisante o el virus del mosaico de la alfalfa necesitan que los transgenes sean traducibles (Brededore y col., 1995; Carr y col., 1992; MacFarlane y Davies, 1992), la resistencia conferida por el dominio de la polimerasa del también tobamovirus PMMoV o de PVX no requiere la traducibilidad del gen (Baulcombe, 1994; Mueller y col., 1995; Tenllado y col., 1996).

En el caso de CMV, se han obtenido plantas de tabaco resistentes a la infección mediante la expresión de una versión truncada de la proteína 2a (Anderson y col., 1992). Actúa inhibiendo el proceso de replicación viral y consiguientemente, limitando los procesos de movimiento, quedando la infección localizada en las células de la

túnica (Carr y col., 1994; Wintermantel y col., 1997; Zaitlin y col., 1994). Aunque inicialmente, los experimentos de microinyección indicaban que se producía una inhibición del transporte de la proteína p3a, estudios posteriores descartaron esta posibilidad (Canto y Palukaitis, 1999; Nguyen y col., 1996). La especificidad de la respuesta revelada porque sólo se confiere resistencia a cepas con una elevada homología de secuencia, indica que la diana es el RNA2 (Hellwald y Palukaitis, 1995). Al igual que en las resistencias mencionadas anteriormente, se desconocen los requerimientos de ésta, puesto que plantas que expresan diferentes construcciones de transgenes no traducibles eran susceptibles a la infección (Wintermantel y Zaitlin, 2000), a pesar de que los datos apuntan a que la resistencia es mediada por el RNA.

Por otro lado, la expresión del RNA1 de CMV-Fny expresado transgénicamente en plantas de tabaco, media la supresión del RNA1 viral homólogo y previene la entrada de CMV en el floema (Canto y Palukaitis, 1998; 2001). Es necesario un alto grado de homología entre la secuencia entre transgén y el RNA viral para la supresión, lo que indicaría que se trata de un mecanismo de VIGS. Sin embargo, a diferencia de ésta, la infección previa de la planta no conlleva a la resistencia de las hojas sistémicas.

Finalmente, cuando las proteínas 1a y 2a de CMV, son expresadas en la misma planta transgénicamente, se genera un replicón viral (Mori y col., 1992; Suzuki y col., 1996) que confiere resistencia a la invasión sistémica del huésped (Suzuki y col., 1996).

La dilucidación de los mecanismos básicos de las resistencias conferidas por transgenes traducibles de CMV se ven complicada por la existencia de la proteína 2b que al actuar como supresor de la señalización del silenciamiento interfiere con los análisis.

1.5.3.- Resistencia mediada por proteínas de movimiento

Los primeros trabajos sobre esta resistencia fueron aportados por Lapidot y col. y Malysenko y col. en 1993, utilizando TMV y tabaco como sistema modelo. En ambos se detectó que la expresión de la MP de TMV afuncional confería protección frente a la infección de TMV. Así, cuando se expresaba una proteína termosensible –afuncional a 33 °C- se observó que la resistencia era operativa a 33 °C pero no a 25 °C, temperatura a la que el mutante utilizado se comporta como la MP del virus salvaje (Malysenko y col., 1993). Una protección similar se obtuvo al expresar una forma no funcional de la MP de TMV, conteniendo una delección entre los aa 3-5 (Lapidot y col., 1993). Además, Malysenko y col. (1993) mostraron que la expresión transgénica de la

MP de BMV, huésped al que no infecta este virus, confiere resistencia a TMV. Por ello, los autores postulan que en este huésped, las MPs afuncionales se comportan como mutantes dominantes negativos (Herskowitz, 1987).

La resistencia mediada por la MP se manifiesta en un retraso en el nº y tamaño de los focos de infección –medidos en LLN- y por un retraso o supresión de la acumulación local y/o sistémica del virus y es eficaz frente a virus DNA y RNA, si bien los mecanismos son desconocidos, aunque en general va asociada a los niveles de acumulación de la proteína y del correspondiente transgén (Lapidot y col., 1993). Se postula que su acción es debida a la competición de dicha proteína con la proteína salvaje a los sitios de unión de los plasmodesmos y/o otros componentes celulares (Ares y col., 1998; Beck y col., 1994; Cooper y col., 1995; Duan y col., 1997; Hou y col., 2000; Lapidot y col., 1993; Malysenko y col., 1993; Tacke y col., 1997).

A diferencia de la protección conferida por la CP, para que esta resistencia sea activa frente al virus homólogo, la MP requiere ser afuncional para el movimiento. Por el contrario, la expresión de MPs funcionales suele incrementar la susceptibilidad a la infección del virus homólogo, que se traduce en la aparición más temprana de los síntomas - en algunos casos va acompañada por un incremento de su intensidad- y en la mayor acumulación de elementos virales en los primeros estadios de la infección (Ares y col., 1998; Cooper y col., 1995; Sanz y col., 2000). Sin embargo, pueden interferir con la infección por los virus heterólogos como es el caso de la protección ejercida por la expresión de la proteína p24 de PVX frente a TMV o al tobamovirus del pimiento de Obuda (Ares y col., 1998).

Otra característica de esta resistencia, que la distingue de las anteriormente descritas, es que presenta un amplio espectro de eficacia. Así, la expresión transgénica en plantas de tomate de la MP truncada del geminivirus BDMV retarda de manera importante la infección del también geminivirus ToMoV (Hou y col., 2000). La expresión del mutante de delección de la MP de TMV, anteriormente descrito, además de proteger a los tobamovirus, también lo hace frente a nepo-, potex-, caulimo y tobavirus (Cooper y col., 1995). De igual forma, la expresión transgénica de la proteína p13/p12 del TGB de los potexvirus del mosaico del trébol blanco o del mosaico aucuba de la patata confiere resistencia frente a otros potex- y carlavirus que también poseen un TGB, pero no a TMV o a PVY, virus que carecen de TGB (Beck y col., 1994; Seppanen y col., 1997). Las diferencias encontradas en las interferencias con los virus heterólogos cuando se expresan la proteína p25 de PVX o la MP de TMV,

indican que no todas las regiones de las MP son igualmente eficaces para la restricción heteróloga de los virus.

En otros casos en los que se ha detectado resistencia en las plantas que fueron transformadas con secuencias de proteínas de movimiento del tospovirus de las manchas bronceadas del tomate o del comovirus del mosaico del chícharo, la protección resultó estar mediada por el RNA y no por la proteína (Prins y col., 1997; Sijen y col., 1995).

1.5.4.- Resistencia mediada por RNAs antisentido

Aunque inicialmente se postulaba que esta estrategia podría ser útil para el control de las enfermedades virales, fue abandonada por los resultados más prometedores obtenidos con la expresión de la CP (v.g., Cuozzo y col., 1988). No obstante, en ciertos casos se ha demostrado que la expresión del gen antisentido de la CP y la región 3'-NC del potexvirus CyMV en plantas de tabaco, confiere un alto grado de resistencia a este virus (Lim y col., 1999). Esta protección, al ser mediada por RNA, es activa sólo frente a virus estrechamente relacionados (Baulcombe, 1996; 1999) y aunque se desconocen sus mecanismos de acción, se barajan diversas hipótesis para explicarla: a) interferencia con la traducción de posibles proteínas cuando el RNA antisentido deriva de un gen, b) bloqueo por hibridación con la secuencia complementaria del virus de los lugares de reconocimiento de alguna proteína viral o del huésped, necesaria para la infección viral, o por competición con el RNA viral por el secuestro de alguno de estos factores y c) formación de un RNA de doble cadena entre el mRNA del transgén y el RNA del virus desafiante que sería susceptible a la degradación por endonucleasas y consiguiente activación del mecanismo de PTGS (VIGS) (Baulcombe, 1996; 1999; Beachy, 1997).

1.5.5.- Resistencia mediada por RNA satélites

La identificación de los RNAs satélites como parásitos moleculares, cuya presencia en las infecciones virales disminuye drásticamente el contenido de los RNAs del virus ayudante, llevó a la obtención de plantas transgénicas que expresaban satélites de CMV o del nepovirus (TRSV) (Gerlach y col., 1987; Harrison y col., 1987). Aunque el grado de protección encontrado era relativamente bueno, y en el caso de CMV se observaba protección a altas dosis de inóculo frente a cepas distanciadas filogenéticamente, su empleo en los cultivos quedó descartada por los riesgos

biológicos que conlleva, dada la alta variabilidad de estos RNAs de pequeño tamaño y la selección de variantes de secuencia con propiedades deletéreas para los cultivos, como la inducción de necrosis generalizada en plantas de tomate (Gallitelli, 2000; García-Luque y col., 1984; Tepfer, 2002).

1.5.6.- Resistencia mediada por RNAs bicatenarios

El descubrimiento del mecanismo de PTGS (VIGS) y la probada eficacia en el control de las infecciones virales, llevó a Waterhouse y col. (1998) a diseñar un elegante experimento para discriminar cuál sería la forma más eficaz de inducir esta respuesta: con RNA mensajero, antisentido o bicatenario. De esta forma demostraron que la introducción en las plantas de los RNAs bicatenarios aumentaba entre 5 y 10 veces la proporción de plantas inmunes a la infección como consecuencia de la activación de PTGS. Esta tecnología también ha sido aplicada a CMV- mediante la transformación de plantas de tabaco con una repetición invertida de un fragmento del gen de la CP (Kalantidis y col., 2002) y al virus de la sharka (Pandolfini y col., 2003). En este último caso, la resistencia se activa con la expresión de tan sólo 192 nt que contiene el codón de iniciación de la poliproteína viral. En todos los casos se obtienen plantas inmunes a la infección. Las ventajas de esta estrategia son obvias, por un lado se obtiene un elevado grado de protección, de forma que algunas plantas no se puede detectar el virus; la cantidad de secuencias virales que requieren ser expresadas son mínimas, con lo cual se reducen los riesgos derivados de la utilización de genes virales.

Las mayores limitaciones de las estrategias de control de las virosis es su especificidad y su caducidad por lo que se hace necesario explorar nuevas vías de control. En este contexto, las MPs podrían ser buenos candidatos para obtener una resistencia de amplio espectro y duradera.

En estudios anteriores se habían obtenido plantas de tabaco que expresan constitutivamente diversos mutantes de delección del gen de la proteína p3a denominados M1-M10 (Sanz 2000). Éstos contenían las siguientes delecciones en el gen 3a y en su correspondiente proteína:

- M2**: nt Δ 499-528, aa Δ 134-143.
- M3**: nt Δ 529-558, aa Δ 144-153.
- M5**: nt Δ 589-618, aa Δ 164-173.
- M6**: nt Δ 619-648, aa Δ 174-183.
- M8**: nt Δ 671-706, aa Δ 192-203.
- M9**: nt Δ 708-734, aa Δ 204-212.
- M10**: nt Δ 741-779, aa Δ 212-224.

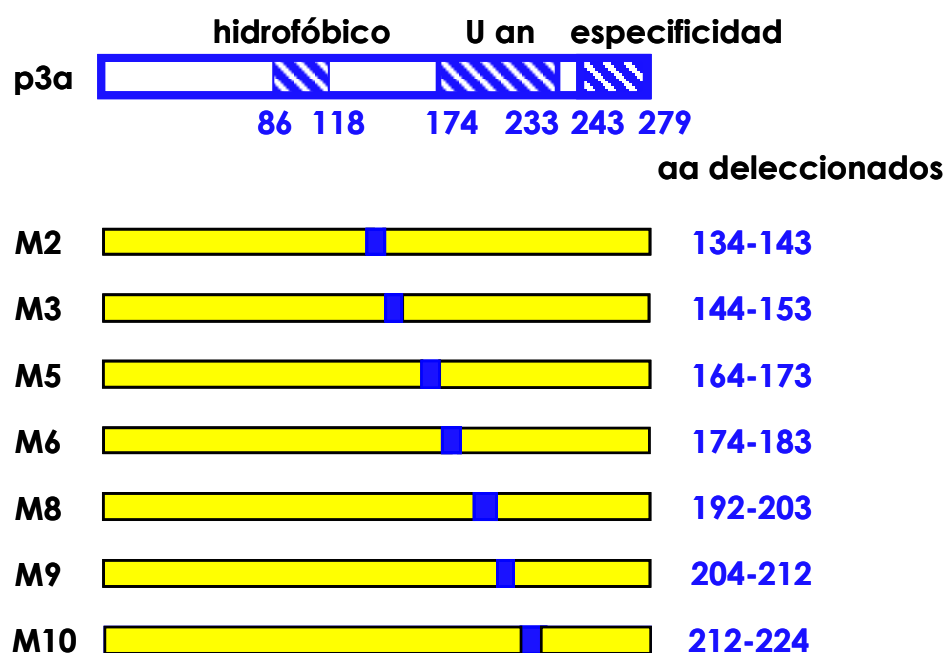


Fig. 1.2. Esquema de las delecciones de la p3a de CMV-24

Los resultados preliminares (Sanz, 2000) obtenidos con dos líneas de plantas independientes de la generación F0 de plantas transformadas con cada una de las distintas mutaciones eran indicativos de que la expresión de los mutantes de p3a alteraba la acumulación viral. Por ello, en el presente trabajo hemos expandido los análisis a otras líneas de plantas que expresan dichos transgenes, con el fin de seleccionar aquellas líneas que tuvieran un comportamiento más eficiente de cara al control de la infección por CMV, donde analizar su mecanismo de acción y estudiar la funcionalidad de dichas proteínas.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Materiales

2.1.1.- Virus

La cepa del virus del mosaico del pepino utilizada en los estudios de protección ha sido CMV-24 (García-Luque y col., 1983), que procede originalmente de muestras de cultivos de melones infectados de Valencia (España).

Para los ensayos de complementación, empleamos un mutante de CMV defectivo en el movimiento célula a célula, CMV-Fny Δ Kpn, cedido amablemente por el Dr. P. Palukaitis (Scottish Crop Research Institute, Dundee, Inglaterra). El RNA 3 de este virus contiene una delección de 501 nt, desde las posiciones 137 a 637, abarcando desde el aa 7 al 173 de la proteína p3a (Kaplan y col., 1995).

2.1.2.- Plantas

Hemos utilizado plantas de *N. benthamiana* Domin; plantas transgénicas de *N. tabacum* L. cv Xanthi nc, que expresan constitutivamente la proteína p3a de CMV-24 correspondientes a la línea 78 (Vaquero y col., 1994), o bien distintos mutantes de delección de dicha proteína denominados M2, M3, M5, M6, M8, M9 y M10 (Sanz, 1996).

Además usamos plantas transgénicas de *N. tabacum* desprovistas de secuencias de CMV, denominadas plantas GUS (Vaquero y col., 1994).

2.1.3.- Estirpes bacterianas

Llevamos a cabo la amplificación de los DNAs plasmídicos usando la estirpe de *Escherichia coli* SURE (Stratagene): e14⁻(mcrA⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan^r), uvrC, [F'proAB lacI^q Δ M15, Tn10(tet^r)].

2.1.4.- Plásmidos

A lo largo de este trabajo hemos usado los siguientes plásmidos:

-**pC3a/9**, que contiene un inserto correspondiente al RNA 3 de CMV-24 (nt 13-1024) incluyendo el gen 3a, 86 nt de la región líder del RNA y 89 nt de la región intergénica (Vaquero y col., 1994).

-**p40**, cuyo inserto corresponde a los 347 nt terminales de la región 3' del RNA 3 (Sanz y col., 2000).

-**pBSK**, que posee un inserto de 300 nt correspondientes al rRNA 18S de la coliflor (Ruiz-García y col., 1997).

2.1.5.- Oligonucleótidos

En nuestros ensayos hemos empleado los siguientes oligonucleótidos:

129: 5'-GTGTGTGTGTCGAGTCGTG, que corresponde a las posiciones 27-45 del RNA 3 de CMV-24.

130: 5'-AACTCACACAGGACACTATAG, secuencia complementaria a las posiciones 995-1014 del RNA 3 de CMV-24.

131: 5'-ACAACAATTACCAACAACAACAA, que corresponde a las posiciones 9-31 de la secuencia líder Ω de TMV.

135: 5'-AGATAACTCCTTGTCGCCTAG, secuencia complementaria a las posiciones 438-458 del RNA 3 de CMV-24.

2.1.6.- Sueros policlonales e IgGs

En este trabajo hemos usado inmunosueros policlonales de conejo específicos para la proteína p3a de CMV-24 (suero anti-3a) (Vaquero y col, 1994) y para la proteína de cubierta de CMV-24 (suero anti-CP).

Asimismo empleamos IgGs purificadas del suero anti-CP de CMV marcadas con fosfatasa alcalina o sin marcar.

Los sueros y las IgGs fueron cedidos amablemente por la Dra. M.T. Serra (CIB. CSIC).

2.1.7.- Tampones y soluciones generales

Tampón de inoculación de virus:

-20 mM fosfato sódico pH 7,0

Tampones de purificación de virus:

-0,5 M citrato sódico pH 6,5

-50 mM citrato sódico pH 7,0

-50 mM citrato sódico pH 7,0, 2% Tritón X-100

Tampón de extracción de ácidos nucleicos:

-Z6: hidrocloreuro de guanidinio 8 M, 20 mM MES, pH 7,0.

-CTAB: 2% CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% β-mercaptoetanol.

Tampones de electroforesis:

Tampones de electroforesis de ácidos nucleicos:

-TAE: 40 mM Tris-acetato pH 8,0, 1 mM EDTA.

-MEN 1x: 20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1,3 mM EDTA, pH 7,0.

-Tampón de carga de ácidos nucleicos. Para las muestras de DNA usamos un tampón que contiene 50% glicerol, 50 mM EDTA pH 8,0, 0,1% azul de bromofenol y 0,1% de xylene cyanol. Para las muestras de RNA, este tampón contenía un 1% de SDS.

-Tampón de carga en geles de agarosa-formaldehído: 0,97X MEN, 4,1% formaldehído, 39% formamida, 0,06 µg/ml BrEt.

Tampón de transferencia de ácidos nucleicos:

-SSC: 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico pH 7,0.

Tampones de electroforesis de proteínas:

-ESB: 75 mM Tris-HCl, 8 M urea, 4,5% SDS, 7,5% β-Mercaptoetanol, 5 mM PMSF.

-Tampón SDS-PAGE: 25 mM Tris, 190 mM glicina, pH 8,3, 0,1% SDS.

-Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 190 mM glicina, pH 8,3, 20% metanol.

Tampones y soluciones para ensayos inmunológicos:

-Tampón Carbonato: 50 mM carbonato sódico pH 9,6.

-Tampón citrato-BSA-PVP: 50 mM citrato sódico pH 7,0, 0,2% BSA, 2% PVP.

-PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato sódico pH 7,2.

-PBS-T: PBS, 0,05% Tween

-PBST-BSA: PBS-T conteniendo 2% de BSA.

-Blotto: PBS-T, 5% leche descremada en polvo.

-Solución de revelado de la fosfatasa alcalina: 3 mM p-nitrofenilfosfato en 0,5 mM Mg₂Cl, 1 M dietanolamina, pH 9,8.

2.1.8.- Medios de cultivo

Para el cultivo de las plantas empleamos el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con micro y macroelementos, con vitaminas (DUCHEFA) y conteniendo un 0,6% de agar así como una concentración de 50 µg/ml de kanamicina (Km).

Para el cultivo de bacterias usamos el medio Luria-Bertani (LB): 1% bacto-triptona, 0,5% de extracto de bacto-levadura, 1% de NaCl pH 7,0. Las bacterias fueron crecidas en placas usando medio LB con un 1,5% de agar y una concentración de 50 µg/ml de ampicilina.

2.2.- Métodos

2.2.1.-Propagación de las plantas

Las semillas de las plantas transgénicas, antes de ser germinadas en medio MS, fueron esterilizadas con lejía diluída al 0,02% (3 veces) y se enjuagaron con agua estéril (3 veces). El gen *npt II*, incorporado a estas plantas, les confiere la capacidad de sintetizar clorofila en presencia de Km.

Tras la germinación, las plántulas se mantuvieron durante 7-10 días en medio MS, hasta la aparición del 1^{er} par de hojas verdaderas. Posteriormente, se transplantaron a tierra.

Las plantas se mantuvieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 25°C, un fotoperiodo de 16 h, humedad relativa del 60% e intensidad lumínica de 10.000 lux.

2.2.2.- Inoculación de las plantas

La inoculación se realizó de forma mecánica, usando como abrasivo carborundo (400 Mesh) y diferentes concentraciones de virus purificados diluídos en tampón de inoculación. Para CMV-24 y CMV-Fny ΔKpn, hemos empleado concentraciones de 25 y 100 µg por ml de tampón de inoculación, respectivamente.

En los ensayos de protección, complementación y para la purificación de CMV-Fny ΔKpn, la inoculación se llevó a cabo en el primer par de hojas verdaderas de las plantas de tabaco, mientras que para el análisis de la localización viral, se inoculó solamente una de estas hojas.

Para la purificación de CMV-24 se inocularon todas las hojas desarrolladas de las plantas de *N. benthamiana*.

2.2.3.- Purificación de virus

La purificación de CMV se realizó siguiendo el método de Lot y col. (1972). CMV-24 se purificó de plantas de *N. benthamiana* a los 7 d.p.i. y CMV-Fny Δ Kpn de plantas de tabaco de la línea 78 (Vaquero y col., 1994) a los 14 d.p.i..

Una vez purificados y determinada su concentración, los virus se conservaron en tampón fosfato 20 mM conteniendo un 20% de glicerol a -80°C.

2.2.4.- Extracción de los RNAs de viriones

La extracción se realizó a partir de los virus purificados, siguiendo la técnica de Kaper y West (1972). Tras determinar la concentración, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en tampón TAE y conteniendo 0,05 µg/ml de BrEt. Finalmente, se conservaron en agua estéril a -80°C.

2.2.5.- Extracción de RNA total de plantas

La extracción del RNA total de plantas se realizó según Logemann y col. (1987). Para ello, el tejido se trituró en presencia de N₂ líquido y se homogeneizó inmediatamente en tampón de extracción Z6. A continuación, se realizó una extracción con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1). Los RNAs fueron precipitados en presencia de 28 mM de ácido acético y 41,2% de etanol, durante 30 min a -20°C y se recogieron mediante centrifugación. A continuación se lavaron con etanol al 70% y el precipitado se resuspendió en agua estéril, calentando a 55°C durante 5-15 min. Adicionalmente y con el fin de eliminar los azúcares de las muestras, a la solución de RNA purificado se le añadió 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,3 y se incubaron durante 20 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 9.500 r.p.m. durante 10 min en una microcentrífuga y, tras recoger el sobrenadante, el RNA se precipitó con 2,5 vol. de etanol al 100%. Tras una incubación a -20°C, el RNA se recoge por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 10 min. El precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 min. El RNA precipitado se resuspendió en agua desionizada estéril. Una vez cuantificado, se conservó a -80°C.

2.2.6.- Extracción del DNA genómico de plantas

Para llevar a cabo la extracción del DNA genómico de plantas de tabaco utilizamos el método descrito por Dellaporta y col. (1983). El DNA purificado se conservó en agua estéril a -20°C.

2.2.7.- Purificación de DNA plasmídico

Se purificaron plásmidos a pequeña escala (1ml) a partir de cultivos bacterianos utilizando el método de lisis alcalina descrito en Sambrook y col. (1989).

Para realizar purificaciones a mayor escala (a partir de 200 ml de medio de cultivo), se utilizó el Kit "Plasmid Midi Kit" de QUIAGEN, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

2.2.8.- Determinaciones espectrofotométricas

Las concentraciones de virus y de ácidos nucleicos purificados se calcularon tras la determinación del espectro de absorción, utilizándose valores de $E_{260,0,1\%}=5$ para virus (Kaper y col. 1965); $E_{260,0,1\%}=25$ para RNA monocatenario (Kaper y Geelen, 1971) y, $E_{260,0,1\%}=21$ para DNA (Billeter y col. 1966).

2.2.9.- Electroforesis de ácidos nucleicos

El análisis electroforético de los ácidos nucleicos se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa al 0,8%, en tampón TAE, conteniendo 0,5 µg/ml de BrEt. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron mediante irradiación con luz UV (Sambrook y col., 1989).

Para la manipulación del RNA, el material utilizado fue lavado previamente con una solución de SDS al 10%.

2.2.10.- Elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA de interés, se extrajeron de geles de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X conteniendo un 0,5% de BrEt y, fueron eluidos con el Kit "Gen-eluted extraction Kit" (Quiagen), siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.2.11.- Manipulación enzimática del DNA

La manipulación enzimática del DNA con enzimas de restricción, así como con el resto de las reacciones enzimáticas llevadas a cabo en el presente trabajo, se hizo según las especificaciones del proveedor de las mismas y protocolos establecidos (Sambrook y col., 1989).

2.2.12.- Secuenciación de DNA

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en un secuenciador automático de DNA (ABI Prism 337. Applied Biosystem) y los terminadores del kit de reacción "Big Dye" (Perkin Elmer), utilizando los cebadores apropiados.

2.2.13.- Transcripción inversa

La transcripción inversa del RNA viral y transgénico se llevó a cabo según se describe en Tenllado y col. (1994).

La síntesis de cDNA se realizó sobre 0,5 µg de RNA viral purificado o RNA total de plantas en 50 mM Tris-HCl pH 8,9, 50 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂, 25 µM de cada dNTP, 1u. de RNAsin, 1µM del cebador 130 y 1u. de transcriptasa inversa de AMV (Promega) en un volumen final de 20 µl. La reacción transcurrió a 42°C durante 45 min.

2.2.14.- Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador (GeneAmp PCR System 2440, Perkin Elmer) como se describe en Tenllado y col. (1994), utilizando la DNA polimerasa Taq (PROMEGA).

Para ello, 0,5 µg de DNA molde se ajustaron a un volumen final de 50 µl en tampón 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl y 15 mM MgCl₂, incluyendo los cebadores 130 y 131 (en el caso del DNA de los transgenes) y, los cebadores 129 y 130 ó 135 (en el caso de los cDNAs de los virus) a 0,5 µM, los cuatro dNTPs a 0,25 µM y 2 u. de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer).

En todos los casos el programa de amplificación consistió en: 5 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 30 seg a 92°C (desnaturalización), 30 seg a 60°C (hibridación de los cebadores), 1 min a 72°C (elongación) y 7 min adicionales a 72°C.

La reacción de amplificación se verificó cargando 5 µl de la misma en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE, conteniendo 0,5 µg/ml de BrEt. Tras la electroforesis las bandas se observaron mediante luz UV. Como marcador de masa se emplearon los fragmentos del plásmido pUC18 resultantes de la digestión con la enzima de restricción *Sau* IIIA.

2.2.15.- Obtención de sondas de DNA

Las sondas de DNA marcadas radiactivamente se obtuvieron mediante la iniciación al azar de la síntesis del DNA por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I

(Random Primer) siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Amersham-Pharmacia-Biotech) y, en presencia de [^{32}P -dCTP]. Como molde se utilizó el fragmento de 1060 pb que se libera mediante la digestión del plásmido pC3a/9 con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III. Este fragmento contiene la secuencia completa del gen 3a de CMV (Vaquero y col., 1994). Una vez terminada la reacción, las sondas se purificaron a través de una columna de Sephadex G-50 (Roche) y, para su desnaturalización, se calentaron a 95°C durante 5 min antes de ser añadidas a la solución de hibridación.

2.2.16.- Obtención de sondas de RNA

Las sondas de RNA utilizadas para detectar los RNAs de CMV y CMV-Fny Δ Kpn y las utilizadas para detectar el rRNA 18S fueron marcadas con digoxigenina (Roche). En el primer caso, para la obtención de la sonda que detecta las cadenas positivas de los RNAs virales, se empleó como molde para la reacción de transcripción el plásmido p40 (Sanz y col., 2000). En el segundo caso, para la obtención de la sonda que detecta el rRNA 18S, se empleó como molde el plásmido pBSK (Ruiz-García y col., 1997).

Las reacciones de transcripción fueron catalizadas por la enzima T7 RNA polimerasa (New England Biolabs), sobre los plásmidos una vez linearizados con la enzima de restricción *Hind* III siguiendo las sugerencias del fabricante (Roche).

2.2.17.- Transferencia e hibridación de los RNAs totales (Northern-blot)

Para el análisis de Northern blot, las muestras de RNA (5 μg) se desnaturalizaron a 55°C durante 15 min en presencia del tampón de carga de geles de agarosa-formaldehído. Se fraccionaron en geles de agarosa al 1,5% y formaldehído al 16%, utilizando como electrolito el tampón MEN, aplicándosele una corriente de 7 V/cm durante 2 h. Una vez visualizados por iluminación con UV, los RNAs fueron transferidos por capilaridad a membranas de nylon Hybond-N (Amersham-Pharmacia Biotech), según el método descrito por Sambrook y col. (1989), y se fijaron a la membrana por irradiación con luz UV (1200 J) en un aparato UV Stratalinker.

Para la hibridación con sondas de DNA marcadas con [α - ^{32}P]dCTP (aptdo. 2.2.16), las membranas se incubaron durante 1-2 h a 42°C en solución de prehibridación (50% formamida, 6x SSC, 0,5% SDS, 5x Denhardt's y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA desnaturalizado de esperma de salmón) y se hibridaron con la sonda (1×10^6 c.p.m./ml) a 42°C durante 12-16 h en la solución de hibridación (50% formamida, 6x SSC, 0,5% SDS,

3,3% de sulfato de dextrano 500, y 100 µg/ml de DNA desnaturalizado de esperma de salmón). Una vez hibridadas, las membranas se lavaron dos veces en solución 2x SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente durante 15 min, en 0,2x SSC, 0,1% SDS a 48°C durante 15 min y, finalmente, en 0,2x SSC, 0,1% SDS a 58°C durante 15 min. Se dejan secar y se exponen en películas sensibles a rayos X (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia Biotech).

Cuando utilizamos sondas de RNA marcadas con digoxigenina (aptdo. 2.2.16), las membranas fueron prehibridadas e hibridadas a 65°C durante 16 h, siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se lavaron dos veces con 2X SCC/0,1% SDS a temperatura ambiente durante 5 min, y dos veces con 0,1X/0,1% SDS a 65°C durante 30 min. La detección de las señales de hibridación por luminiscencia se realizó mediante el kit "DIG luminiscence detection" (Roche), según las indicaciones del proveedor.

Posteriormente, para comprobar la carga del RNA total, algunas de estas membranas se hibridaron con la sonda del rRNA 18S.

2.2.18.- Detección de los RNAs virales en improntas de tejido

Las hojas, tallos y peciolo de interés, se separaron de las plantas cortándolos con una cuchilla estéril. En el caso de las hojas, el haz fue espolvoreado ligeramente con el abrasivo carborundo antes de ser colocado sobre la membrana de nylon (Hybond N, Amersham-Pharmacia Biotech). A continuación, sobre el material vegetal se ponía un papel 3MM y se presionaba ligeramente con un cilindro de cristal. Tras la impresión, los tejidos se retiraban de la membrana cuidadosamente.

Posteriormente, los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana mediante irradiación con luz UV (1200 J) en un aparato UV Stratalinker.

La detección de los RNAs virales se llevó a cabo mediante la hibridación de estas membranas con la sonda de RNA de CMV marcada con digoxigenina (aptdo. 2.2.17).

2.2.19.- Fraccionamiento subcelular del tejido vegetal

Para determinar la localización subcelular de los mutantes de delección de la proteína p3a en las diferentes líneas de plantas de tabaco transgénicas seguimos el método descrito por Vaquero y col. (1994). Realizamos el fraccionamiento subcelular en hojas maduras, de 12 cm de longitud. Como controles usamos plantas de la línea 78 y plantas GUS (aptdo. 2.1.2).

Las proteínas p3a de las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas mediante ensayos de Western-blot (aptdo. 2.2.21), usando el suero anti 3a.

2.2.20.- Extracción de proteínas totales

La extracción de las proteínas totales de las plantas se realizó a partir de las mismas muestras de las que se aisló el RNA total. Las fases fenólicas obtenidas en el proceso de extracción de RNA, que contenían las proteínas, se sometieron a una precipitación con 5 vol. de 0,1M acetato amónico/metanol durante 2-16 h a -20°C y, posteriormente se centrifugaron a 13.000 r.p.m. en una microfuga durante 7 min. El precipitado se lavó con acetona al 80%, se secó al aire y se resuspendió en 1ml de ESB por gramo de tejido fresco. La suspensión obtenida se calentó a 37°C durante 30 min y seguidamente a 95°C durante 10 min. Seguidamente, las muestras fueron sonicadas durante 10 min, antes de ser aplicadas en el gel.

2.2.21.- Detección de proteínas ("Western-blot")

Los extractos proteicos se analizaron en geles de acrilamida-poliacrilamida (30:0,8) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Para ello, se usaron geles del 5 y 12,5% como concentradores y separadores, respectivamente. La electroforesis se realizó durante 3 h aplicando una corriente de 5 y 12,5 voltios/cm mientras las muestras se encontraban en el gel concentrador y separador, respectivamente. Las masas de las proteínas se estimaron comparando su movilidad electroforética con la de los marcadores de masa conocidos SeeBlue (Invitrogen).

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Hybond P, Amersham-Pharmacia Biotech) en el aparato Miniprotean (BIO-RAD) y a una corriente de 250 mA durante 1 o 1,5 h., según se fueran a detectar las proteínas p3a o CP, respectivamente. Una vez finalizada la electroforesis las membranas se sumergieron durante 30 min en la solución Blotto y se incubaron durante 16 h con el inmunosuero específico frente a la proteína p3a diluído 1:200, o con el inmunosuero frente a la proteína CP diluído 1:5.000. A continuación, las membranas se incubaron con suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (GAR-PO) (Nordic Immunological Laboratories, Holanda) diluído 1:5.000 en la solución Blotto a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, se detectó la actividad enzimática

unida al anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia usando el sistema ECL (Enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech).

2.2.22.- Recogida de muestras. Detección y cuantificación de CMV mediante ensayos de ELISA-DAS. Análisis de datos

Para determinar la acumulación viral en las plantas inoculadas, recogimos muestras de las hojas inoculadas y de la 2ª y 3ª hoja por encima de éstas (hojas sistémicas) a los 7 y 14 d.p.i. Para cada una de las líneas de transformantes usamos un total de 6-12 plantas.

Las muestras vegetales se prepararon mediante la homogenización de 250 mg de tejido foliar fresco en 250 µl tampón citrato-BSA-PVP.

Las placas (E.I.A. Plate, COSTAR) se tapizaron con 200 µl/pocillo de una solución de IgGs purificadas del inmunosero de la CP de CMV-24 a una concentración de 0,049 µg/ml en tampón carbonato, a 37°C durante 2 h. Tras ser lavadas con PBS-T, los sitios de unión libre de la placa se bloquearon con 200 µl de PBST-BSA a temperatura ambiente durante 30 min.

Posteriormente, añadimos 2 µl de cada muestra en 200 µl de tampón citrato-BSA-PVP/pocillo. En todos los análisis las muestras se colocaron por duplicado. Las placas se incubaron a 4°C durante 16 h. Transcurrido este tiempo, añadimos 200 µl/pocillo de las IgG anti-CMV marcadas con fosfatasa alcalina diluido en tampón PBST-BSA (1:15.000) y las incubamos a 37°C durante 2 h. A continuación, añadimos 200 µl de la solución de revelado de la fosfatasa alcalina.

El producto de la reacción se cuantificó colorimétricamente midiendo la absorbancia a 405 nm en cada uno de los pocillos en un lector de microplacas EAR 400 SLT-Labinstruments.

En todos los ensayos incluimos una escala de concentraciones desde 4 hasta 500 ng de virus purificado, con la que se determinó una recta de regresión sobre la que se extrapolaron las absorbancias correspondientes a las muestras analizadas. Una vez transformadas las absorbancias a concentraciones (ng de virus/mg de tejido), les aplicamos el modelo de Dunnett Two-Tailed (programa estadístico SuperANOVA v. 1.11, Abacus Concepts, Inc.), que determina el error standard entre individuos de la misma población y establece diferencias significativas entre poblaciones respecto a una población control.

2.2.23.- Análisis computacional de la proteína 3a

La predicción de la estructura E2 de la proteína se realizó utilizando el servidor PredictProtein (<http://www.emblheidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) y los algoritmos PHD (Rost y Sander, 1993) y PROF (Rost, 1996).

Para la identificación de una posible estructura terciaria de la proteína se utilizaron 5 métodos diferentes: 3D-PSSM (Kelley y col., 1999), TOPITS (Rost, 1995), FUGUE (Shi, 2001), Superfamily (Gough y col., 1991), y GenTHREADER (MacGuffin y Jones, 2003). Para la búsqueda de dominios de transmembrana se utilizó el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) (Moller y col., 2001).

3.- RESULTADOS

3.1.- Caracterización de las plantas M2

3.1.1- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM2

Con objeto de determinar si la proteína pM2 mantiene la funcionalidad para el movimiento viral de la proteína p3a, analizamos su capacidad para complementar *in trans* el movimiento del virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn. Para ello, seleccionamos las líneas de plantas independientes M2.1.3.2 y M2.66.1.7 correspondientes a la generación F2. En primer lugar, procedimos a analizar los niveles de acumulación del mRNA del transgén y de su correspondiente proteína pM2 en cuatro plantas M2.1.3.2. y tres plantas M2.66.1.7. Como plantas control usamos plantas 78 –que expresan constitutivamente la proteína p3a- y plantas GUS –desprovistas de secuencias de CMV- (Vaquero y col., 1994). Los ensayos de Northern blot (Fig. 3.1), llevados a cabo sobre preparaciones de RNA totales de las plantas y utilizando como sonda DNA correspondiente al gen de la proteína p3a marcado radioactivamente- revelaron la presencia del RNA M2 en las siete plantas M2 analizadas. Este RNA poseía una movilidad electroforética menor que el detectado en la línea 78 (Fig. 3.1). Asimismo, los ensayos de inmunodetección realizados sobre los extractos de proteínas totales de estas plantas con el suero específico frente a la proteína p3a mostraron la presencia de la proteína pM2 en las siete plantas analizadas. La movilidad electroforética de esta proteína era mayor que la de la proteína p3a expresada en las plantas 78, indicativa de su menor masa aparente (Fig. 3.1).

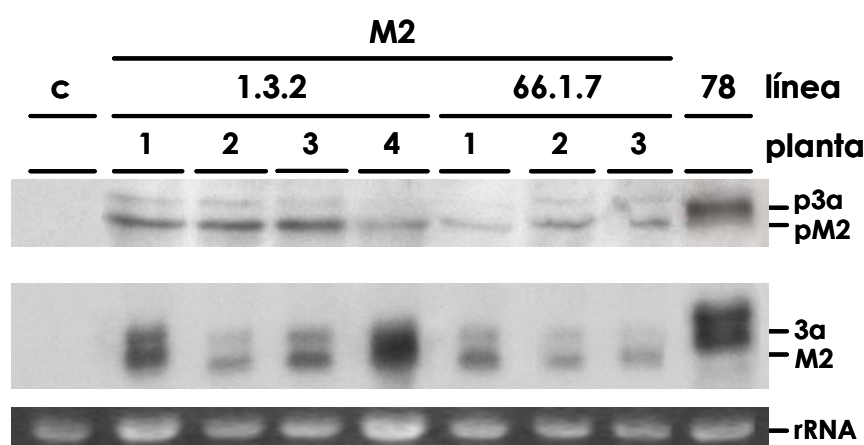


Fig. 3.1. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM2 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en plantas M2.1.3.2 y M2.66.1.7. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

En estos análisis observamos unos niveles de acumulación heterogéneos tanto del RNA M2 como de la proteína pM2, si bien detectamos contenidos superiores de ambos en las plantas de la línea M2.1.3.2.

Basándonos en la acumulación de la proteína pM2, seleccionamos dos individuos diferentes para llevar a cabo los experimentos de complementación. Las plantas elegidas: M2.1.3.2 (planta nº 3) y M2.66.1.7 (planta nº 3) que presentaban contenidos altos e intermedios de la proteína pM2, respectivamente (Fig. 3.1). Como controles negativos y positivos usamos dos plantas GUS y dos plantas 78, respectivamente.

Tras la inoculación de las plantas con el mutante CMV-Fny Δ Kpn, determinamos la cinética de acumulación de los RNAs virales en las hi a los 3, 5 y 7 d.p.i y en las hs (2ª y 3ª h.p.e.i.) a los 7 y 14 d.p.i, mediante ensayos de Northern blot en los extractos de RNA totales. Para ello, utilizamos la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV, que no detecta los transgenes virales de las plantas (datos no mostrados).

En las plantas GUS, encontramos los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn únicamente en las hi a los 3 d.p.i. En las dos plantas M2, los RNAs virales mostraron una cinética de acumulación ascendente en estas hojas, alcanzando el máximo a los 7 d.p.i. Además, la cantidad detectada en las hi de la planta M2.1.3.2.3 fue superior a la encontrada en las de la planta M2.66.1.7.3 en los 3 tiempos ensayados (datos no mostrados). En las hs de las plantas GUS y M2.66.1.7.3 no hallamos los RNAs virales en ninguno de los dos tiempos ensayados; sin embargo, los encontramos a los 14 d.p.i. en las hs de la planta M2.1.3.2.3. En las plantas 78 detectamos los RNAs virales en ambos tipos de hojas y en todos los tiempos ensayados, con cinéticas de acumulación ascendentes y niveles de acumulación muy superiores al resto de las plantas (datos no mostrados).

Estos resultados indicaban que la proteína pM2 es capaz de complementar *in trans* el movimiento célula a célula del virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn; si bien los niveles de expresión de la proteína pM2 parecían ser determinantes para la complementación del movimiento a larga distancia.

Para comprobar estos resultados, realizamos un segundo experimento con cinco plantas pertenecientes a la línea M2.1.3.2 (plantas nº 5-9, Fig. 3.2 A). Como en el experimento anterior, detectamos el RNA M2 y su correspondiente proteína pM2 en todas las plantas analizadas, mediante los ensayos de Northern y Western blot. De nuevo observamos heterogeneidad en los contenidos de los RNAs M2 y de las proteínas pM2 entre las distintas plantas, si bien las diferencias eran más acusadas en

los RNAs. Además, en las plantas nº 6, 7 y 9 encontramos un mayor contenido de proteína pM2 que en las plantas nº 5 y 8.

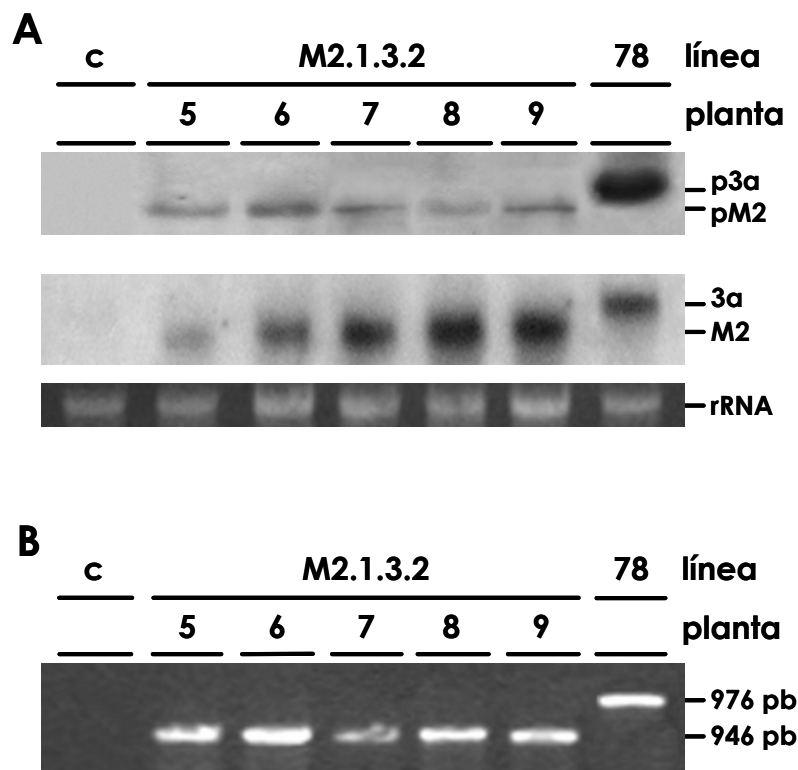


Fig. 3.2 A. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM2 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en plantas M2.1.3.2. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

B. Análisis, mediante RT-PCR, de los RNAs derivados de los transgenes de las plantas M2.1.3.2. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados. El tamaño de las bandas obtenidas se indica a la derecha de la figura.

Con el fin de corroborar la secuencia del transgén, amplificamos mediante RT-PCR los RNAs derivados de los transgenes de las plantas M2 y 78, utilizando los cebadores 131, correspondiente a la secuencia líder de TMV presente en los transgenes y 130, correspondiente a la secuencia intergénica del RNA 3 de CMV-24- (aptos. 2.1.5, 2.2.13 y 2.2.14 de M. y M.). El análisis electroforético de los productos de reacción (Fig. 3.2 B) mostró la presencia de una banda de DNA de 976 pb en la muestra de la planta 78, correspondiente al transgén 3a, mientras que en las cinco

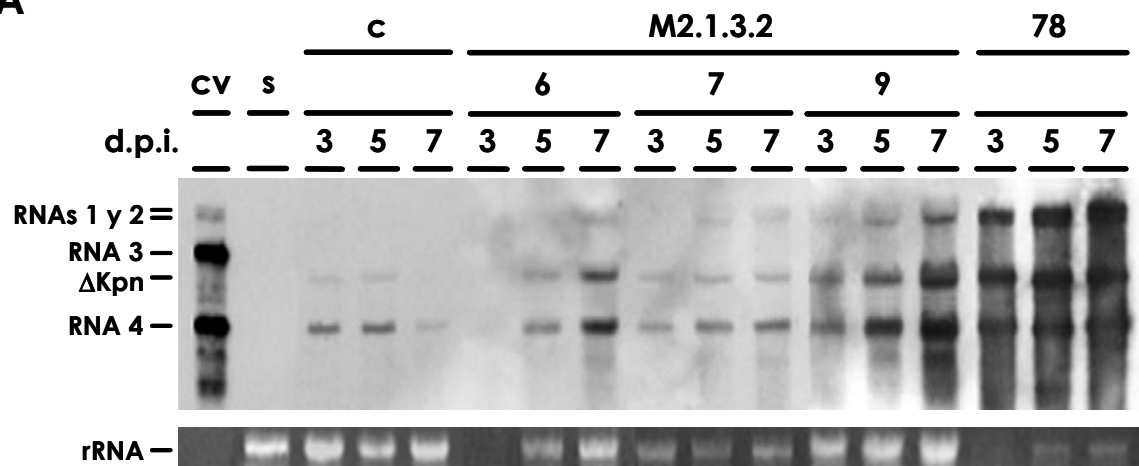
plantas M2.1.3.2 se detecta una banda de menor tamaño (946 pb). La amplificación de los RNAs de la planta GUS, control negativo de la reacción, no produjo ninguna banda. Posteriormente, determinamos la secuencia nucleotídica de dos de estas bandas (plantas nº 8 y 9), y comprobamos que ambas correspondían a secuencias M2 que contenían la delección de 30 nt, desde los nt 499 a 528 en el gen 3a.

Para analizar la funcionalidad de la proteína pM2 transgénica, inoculamos las cinco plantas M.2.1.3.2 así como los correspondientes controles (plantas 78 y GUS) con el virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn, y seguimos la acumulación viral tanto en las hi como hs a los tiempos p.i. mencionados anteriormente, mediante ensayos de Northern blot. En este experimento (Fig. 3.3), detectamos los RNAs virales en las plantas GUS en cantidades descendentes a lo largo de los tiempos ensayados, y sólo en las hojas inoculadas. De forma similar, sólo fue posible hallarlos en las hojas inoculadas de dos plantas M2.1.3.2 (nº 5 y 8). En éstas, y a diferencia de las plantas GUS, observamos una cinética de acumulación ascendente de dichos RNAs. A los 3 y 5 d.p.i. su contenido era similar a los de la planta nº 7 aunque inferior a los 7 d.p.i. (datos no mostrados y Fig. 3.3 A). En las otras tres plantas M2 analizadas (plantas nº 6, 7, y 9) encontramos los RNAs virales en las h.i. a los 3, 5 y 7 d.p.i. en cantidades crecientes (Fig. 3.3 A); así como a los 14 d.p.i. en las hs (Fig. 3.3 B).

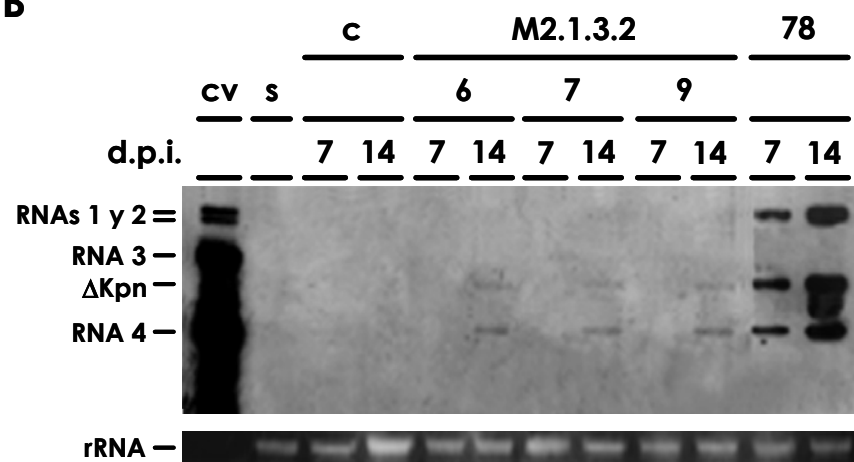
Fig. 3.3. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación de los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hi **(A)** y en las hs **(B)** de las plantas control GUS (c), plantas M2.1.3.2 y plantas 3a (78), a los tiempos indicados en la figura. Δ Kpn: RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn; cv: RNA de CMV-24 control; s: RNA total de planta control sana. Los nº 6, 7, 9 indican los distintos individuos M2.1.3.2 ensayados. Las posiciones de los RNAs 1, 2 y 3 se indican a la izquierda de la figura. Debajo de cada gel se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

C. Análisis, mediante RT-PCR, del RNA 3 en las hs de las plantas control GUS (c), plantas M2.1.3.2 y plantas 3a (78), a los tiempos indicados en la figura. CMV-24: RNA de CMV-24 control; CMV-Fny Δ Kpn: RNA control de CMV-Fny Δ Kpn. Los nº 5, 6, 7, 8 y 9 indican los distintos individuos M2.1.3.2 analizados. El tamaño de las bandas de amplificación se muestra a la izquierda de la figura.

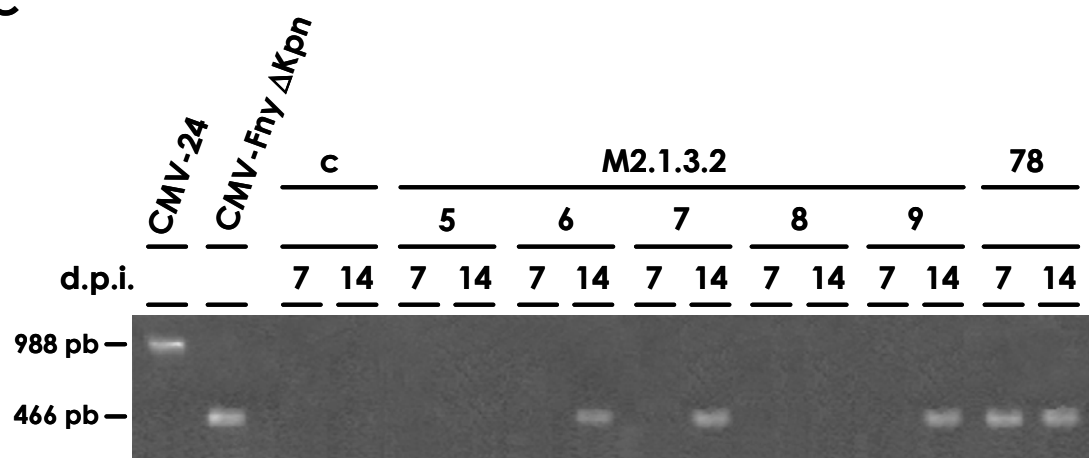
A



B



C



En las plantas 78, el RNA viral fue detectado en los dos tipos de hojas y en todos los tiempos analizados en cantidades ascendentes y superiores a los de las plantas M2.1.3.2. (Fig. 3.3 A y B). La movilidad electroforética del RNA 3 acumulado en todas estas plantas era menor que la del RNA 3 de CMV-24, indicando que se trata del RNA 3 delecionado de CMV-Fny Δ Kpn.

No obstante, para corroborar los datos de la acumulación viral en las hs obtenidos mediante los ensayos de Northern y comprobar la identidad del RNA 3 detectado, llevamos a cabo la amplificación de dichos RNAs mediante ensayos de RT-PCR, utilizando los cebadores 129 y 135 (aptdos. 2.1.5, 2.2.13 y 2.2.14 de M. y M.). Como controles usamos los RNAs encapsidados virales de CMV-24 y CMV-Fny Δ Kpn. La amplificación de éstos resultó en dos bandas de DNA de 988 y 466 pb, respectivamente (Fig. 3.3 C). Asimismo, visualizamos bandas de 466 pb tras la amplificación de los RNAs extraídos de las hs de las plantas nº 6, 7 y 9 de la línea M2.1.3.2 a los 14 d.p.i., así como de los RNAs de las plantas 78 a los 7 y 14 d.p.i. La amplificación de los RNAs extraídos a partir de las hs de las plantas M2.1.3.2 (nº 5 y 8) y de las plantas GUS a los 7 y 14 d.p.i. no produjo ninguna banda.

La secuenciación de dos de estas bandas (plantas nº 6 y 78) reveló que en ambos casos correspondían a las secuencias del RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn, y por tanto, se descartaba la posibilidad de que la presencia viral en las hs de las plantas M2 y 78 fuera debida a que el virus defectivo hubiese sufrido algún suceso de recombinación o mutación que restaurara la función de movimiento viral.

Los datos obtenidos muestran que la proteína pM2 es capaz de complementar *in trans* las funciones de movimiento viral, si bien es menos eficaz que la proteína p3a, puesto que las tasas de acumulación viral son inferiores y el movimiento sistémico está retrasado en las plantas M2 respecto a las plantas 78. Además, nuestros resultados indican que existe una correlación entre el contenido de la proteína pM2 y la capacidad para complementar el movimiento a larga distancia viral.

3.1.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM2 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Con el fin de determinar si la expresión constitutiva de la proteína pM2 en las plantas de tabaco podría influir en el desarrollo de la infección del virus homólogo, llevamos a cabo el seguimiento de la infección de CMV-24 en plantas pertenecientes a cuatro líneas M2 independientes de la generación F1: 1.3, 34.6, 66.1 y 66.9. Para ello,

observamos el desarrollo de los síntomas y cuantificamos las tasas de acumulación viral en las hi y hs a los 7 y 14 d.p.i. Como controles usamos plantas GUS.

3.1.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

El 75% de las plantas GUS desarrollaron los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, típicos de la infección de CMV-24, en la 2-3ª h.p.e.i. a partir del 5-7º d.p.i.. A los 14 d.p.i., todas las plantas control desarrollaron síntomas que fueron más intensos a partir de la 4-5ª h.p.e.i..

También observamos la sintomatología típica de CMV en algunas plantas M2 pertenecientes a las cuatro líneas analizadas. Los síntomas eran visibles en la 2-3ª h.p.e.i. y consistían en moteado y aclaramiento de venas, si bien eran de menor intensidad que los desarrollados por las plantas control. El resto de las plantas no mostraron síntomas a los 7 d.p.i. El porcentaje de plantas asintomáticas era variable. Así no desarrollaron síntomas el 37,5% de las plantas M2.1.3, el 50% de las plantas M2.34.6 y M2.66.1 y el 25% de las plantas M2.66.9. A los 14 d.p.i., los síntomas se visualizaron a partir de la 4-5ª h.p.i. aunque, al igual que en el primer tiempo analizado, de menor intensidad que los de las plantas GUS. Por otro lado, el porcentaje de plantas M2 que mostraron síntomas fue mayor que a los 7 d.p.i. de forma que todas las plantas M2.34.6 eran sintomáticas, aunque el 25% de las plantas M2.1.3 y el 12,5% de las plantas M2.66.1 y M2.66.9 no desarrollaron síntomas.

3.1.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral en las hi de las plantas control (determinada mediante ensayos de ELISA-DAS) fue de $39,84 \pm 8,57$ ng de virus/mg de tejido a los 7 d.p.i. y de $42,54 \pm 6,93$ ng de virus/mg de tejido a los 14 d.p.i. (Fig. 3.4).

En estas hojas, la carga viral determinada a los 7 d.p.i. en el 87,5 y el 100% de las plantas M2.1.3 y M2.34.6, respectivamente, fue inferior a la de las plantas control ($10,73 \pm 1,23$ ng de virus/mg de tejido), y en el 12,5% de las plantas M2.1.3 no se detectó el virus. Sin embargo, a los 14 d.p.i., el contenido viral de las plantas de estas dos líneas fue superior al de las plantas control ($214,90 \pm 34,70$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.4).

En las hi de las plantas M2.66.1 y M2.66.9 la acumulación viral a los 7 d.p.i. fue semejante a la de las plantas control en el 100% y en el 87,5% de las mismas, respectivamente, aunque en el 12,5% de las plantas M2.66.9 no encontramos virus. A los 14 d.p.i., la carga viral de las plantas M2.66.1 también fue similar a la determinada

en las plantas control, mientras que en las plantas M2.66.9 fue muy superior ($359,83 \pm 28,41$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.4).

3.1.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control determinamos acumulaciones virales de $163,62 \pm 21,76$ a los 7 d.p.i. y de $18,46 \pm 2,88$ ng de virus/mg de tejido a los 14 d.p.i. (Fig. 3.4).

Tasas de acumulación inferiores calculamos en las hs de las plantas M2 a los 7 d.p.i., con valores que oscilaban entre $30,84 \pm 6,15$ y $52,87 \pm 25,51$ ng de virus/mg de tejido en las plantas M2.66.9 y M2.66.1, respectivamente. En este tiempo, y al igual que ocurría en las hi, no detectamos el virus en algunas de las plantas M2.1.3 (25%), M2.66.1 (25%) y M2.66.9 (12,5%). A los 14 d.p.i., y a excepción del 25% de las plantas M2.1.3 y del 12,5% de las plantas M2.66.9 en las que no se halló CMV-24, las hs de las plantas de las cuatro líneas M2 contenían una carga viral superior a la determinada en las plantas control, siendo máxima esta diferencia en las plantas M2.66.9 ($142,87 \pm 28,09$ ng de virus/mg de tejido) y mínima en las plantas M2.66.1 ($30,44 \pm 9,32$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.4).

Estos resultados indican que la expresión constitutiva de la proteína pM2 en las plantas de tabaco M2 de la generación F1 (1.3, 34.6, 66.9) va asociada a un aumento de las tasas de acumulación viral en las hi y en las hs en estadíos tardíos de la infección (14 d.p.i.), calculándose un incremento de hasta 8,5 y 7,7 veces sobre el control en las hi y hs de las plantas M2.66.9, respectivamente.

Fig. 3.4. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de plantas M2 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

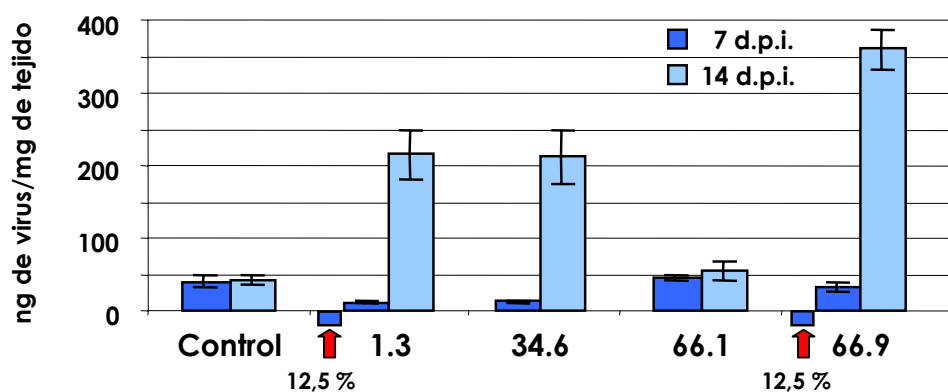
El porcentaje de plantas en el que no detectamos virus se muestran debajo del eje de abscisas. Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Hojas inoculadas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	39,84 ± 8,57	100	42,54 ± 6,93
1.3	87,5	10,73 ± 1,23	100	214,90 ± 34,70
34.6	100	11,71 ± 1,69	100	211,46 ± 36,52
66.1	100	45,69 ± 2,68	100	54,82 ± 12,49
66.9	87,5	31,87 ± 7,23	100	359,83 ± 28,41

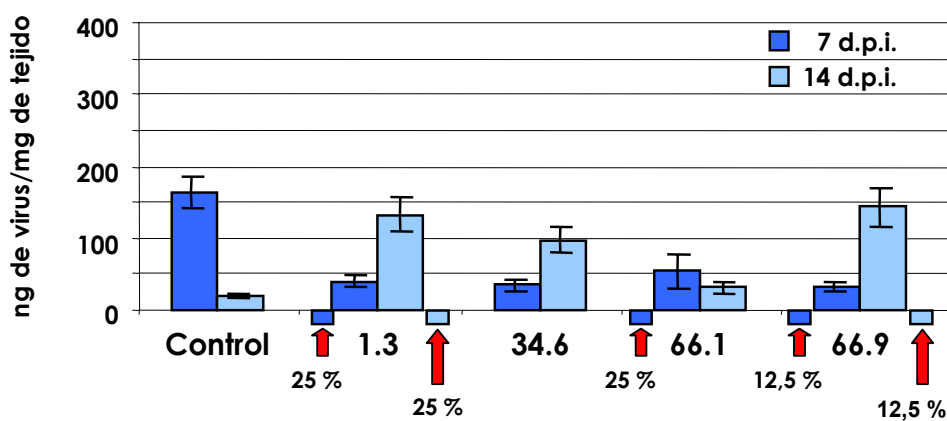


Hojas sistémicas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	163,62 ± 21,76	100	18,46 ± 2,88
1.3	75	39,03 ± 7,87	75	132,49 ± 24,54
34.6	100	34,79 ± 7,75	100	97,09 ± 17,17
66.1	75	52,87 ± 25,51	100	30,44 ± 9,32
66.9	87,5	30,84 ± 6,15	87,5	142,87 ± 28,09



Sin embargo, a los 7 d.p.i., parecía interferir con el proceso de la infección viral, puesto que a este tiempo, en las hi de dos de las cuatro líneas M2 analizadas (1.3 y 34.6) y en las hs de todas ellas encontramos menores tasas de acumulación, así como un cierto número de plantas en las que no fue posible detectar virus en ambos tipos de hojas. Además los síntomas desarrollados por estas plantas eran de menor intensidad que los observados en las plantas control.

3.1.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM2 en plantas de tabaco de la generación F2 frente a la infección de CMV-24

Analizamos el proceso de la infección de CMV-24 en la progenie de las plantas de la generación F1, cuyo comportamiento era representativo de las plantas M2. Así en las plantas nº 2 y 8 de la línea M2.1.3 sólo detectamos el virus en las hi a los 14 d.p.i., aunque la carga viral fue superior: 83,07 y 77,82 ng de virus/mg de tejido, respectivamente, a la de las plantas control ($42,54 \pm 6,93$ ng de virus/mg de tejido). Ninguna de las dos plantas desarrollaron síntomas en el tiempo analizado (14 d.p.i.).

Por otro lado, en la planta M2.66.1.7, la carga viral en las hi y hs a los 7 y 14 d.p.i. fue inferior a la control (7,34 y 100 ng de virus/mg de tejido en las hi a los 7 y 14 d.p.i., y 38,72 y 10,70 ng de virus/mg de tejido, en las hs a 7 y 14 d.p.i., respectivamente). Los síntomas fueron observados a partir de la 6ª h.p.i., y consistían en un suave moteado y aclaramiento de venas.

Como control utilizamos plantas GUS, en un estadio de desarrollado más avanzado que el de las plantas M2, mostrando 5 y 3 hojas completamente desarrolladas, respectivamente.

3.1.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En este caso, el 87,5% de las plantas control desarrollaron los síntomas característicos de la infección por CMV-24 en la 2-3ª h.p.e.i. a partir del 5-7º d.p.i.. A los 14 d.p.i., los síntomas eran más patentes a partir de la 4-5ª h.p.i.

Al contrario de lo que ocurría en el experimento anterior, todas las plantas de las tres líneas M2 ensayadas mostraron los síntomas de moteado y aclaramiento de venas en la 2-3ª h.p.e.i. a partir del 5-7º d.p.i. y en la 4-5ª h.p.i. a los 14 d.p.i. La intensidad de los síntomas desarrollados por las plantas M2.1.3.2 y M2.66.1.7 a los 7 y 14 d.p.i. así como por las plantas M2.1.3.8 a los 7 d.p.i., fue superior a la de las plantas control. Sin

embargo, la sintomatología desarrollada por estas últimas a los 14 d.p.i. fue semejante a la observada en los controles.

3.1.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral determinada en las hi de las plantas control fue de $65,58 \pm 7,57$ y $52,31 \pm 8,97$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. Además, en el primer tiempo analizado no detectamos el virus en el 12,5% de las mismas (Fig. 3.5).

En estas hojas, a los 7 d.p.i., el contenido viral de las plantas de las tres líneas M2 ensayadas fue superior al determinado en las plantas control, detectándose una diferencia más significativa en las plantas M2.1.3.2 ($187,19 \pm 28,88$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.5). A los 14 d.p.i., calculamos, respecto a las plantas control, cargas virales similares en las plantas M2.1.3.2 ($42,26 \pm 6,01$ ng de virus/mg de tejido) e inferiores en las plantas M2.1.3.8 y M2.66.1.7 ($35,55 \pm 3,11$ y $35,17 \pm 4,77$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente) (Fig. 3.5).

3.1.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hojas sistémicas de las plantas GUS hallamos CMV-24 en el 50% de las mismas a los 7 d.p.i.. La carga viral calculada fue de $29,62 \pm 7,57$ ng de virus/mg de tejido. A los 14 d.p.i., las tasas de acumulación viral en el 87,5% de estas plantas fue de $14,85 \pm 0,93$ ng de virus/mg de tejido (Fig. 3.5).

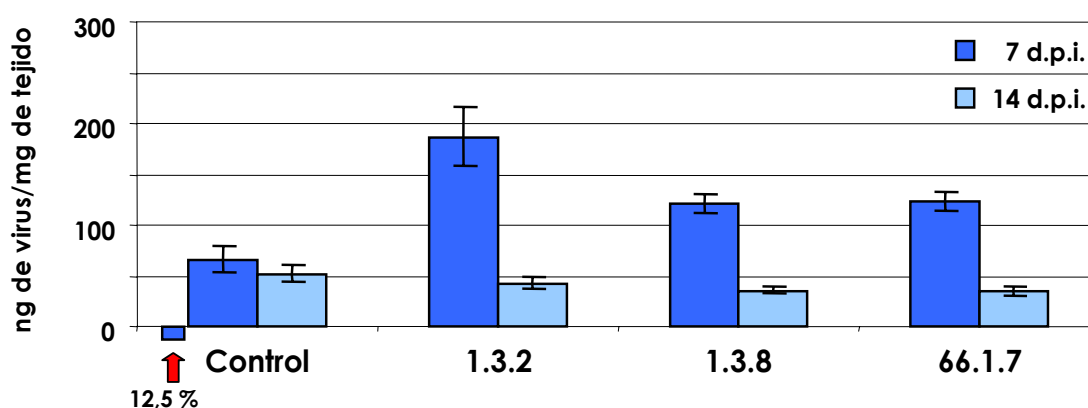
Al igual que ocurría a los 7 d.p.i. en las hi, hallamos niveles de acumulación viral superiores respecto a los controles en las hs de las plantas M2 correspondientes a las tres líneas ensayadas, siendo máxima la diferencia en las plantas M2.1.3.2 ($215,79 \pm 34,96$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.5). A los 14 d.p.i. y respecto a las plantas control, estas plantas M2 también contenían una carga viral ligeramente superior ($22,65 \pm 2,24$ ng de virus/mg de tejido) mientras que la de las plantas M2.1.3.8 y M2.66.1.7 fue similar ($16,71 \pm 1,93$ y $13,75 \pm 0,63$ ng de virus/mg de tejido) (Fig 3.5).

Hojas inoculadas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	87,5	65,58 ± 7,57	100	52,31 ± 8,97
1.3.2	100	187,19 ± 28,88	100	42,26 ± 6,01
1.3.8	100	120,03 ± 9,40	100	35,55 ± 3,11
66.1.7	100	122,15 ± 9,31	100	35,17 ± 4,77

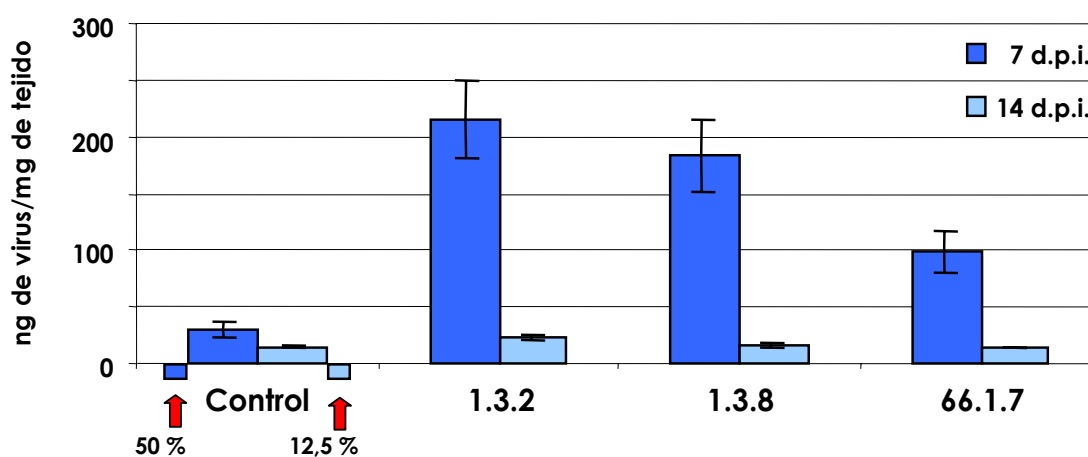


Hojas sistémicas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	50	29,62 ± 7,57	87,5	14,85 ± 0,93
1.3.2	100	215,79 ± 34,96	100	22,65 ± 2,24
1.3.8	100	182,95 ± 32,20	100	16,71 ± 1,93
66.1.7	100	98,53 ± 18,34	100	13,75 ± 0,63



El conjunto de estos resultados indica que la expresión constitutiva de la proteína pM2 en plantas de tabaco conlleva un incremento transitorio de la acumulación viral, tanto en la hi como en la hs, llegando a ser hasta 2,9 y 7,3 veces superior en las plantas M2.1.3.2, respectivamente. Además, este incremento en la carga viral va acompañado de la aparición de síntomas de mayor intensidad que los desarrollados por los controles. A su vez, encontramos que las mayores tasas de acumulación del virus tienen lugar en plantas M2.1.3.2, en las que los niveles de acumulación de la proteína pM2 son superiores a los de las plantas M2.1.3.8 y M2.66.1.7 (Fig. 3.1 y datos no mostrados).

Por tanto, podemos concluir que los mayores niveles de acumulación de virus encontrados van asociados a un mayor contenido en la proteína pM2. Dado que esta proteína es funcionalmente activa para el movimiento viral (aptdo. 3.1.1), los datos apuntan a que el movimiento y por tanto, la invasión del huésped, estarían favorecidos en las plantas M2. No obstante, también podrían ser debidos a una mayor replicación viral en las células de estas plantas.

Fig. 3.5. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de plantas M2 pertenecientes a la generación F2 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

El porcentaje de plantas en el que no encontramos virus se muestran debajo del eje de abscisas. Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.1.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M2

Con el fin de analizar el patrón de invasión viral y determinar si el incremento del contenido de virus en las plantas M2 está asociado con una mayor dispersión de la infección viral, llevamos a cabo la detección del mismo en improntas de tejido (aptdo. 2.2.18 de M. y M), a los 3 y 5 d.p.i.. Para ello, inoculamos con CMV-24 la primera hoja desarrollada de seis plantas GUS y doce plantas M2.1.3.2. El RNA viral fue detectado con la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24 en tres plantas GUS y seis plantas M2.1.3.2, por cada tiempo analizado.

A los 3 d.p.i., tanto en las plantas M2 como en las plantas GUS encontramos los RNAs virales sólo en las hi, aunque el nº y el tamaño de los focos de infección en las plantas M2 eran superiores al de las plantas control (Fig. 3.6).

A los 5 d.p.i., observamos la presencia del virus en las hi, tallos, y ápices de las seis plantas M2.1.3.2 analizadas, y a partir de la 2ª ó 3ª h.p.e.i., según que la planta ensayada tuviera 3 ó 4 hojas desarrolladas. En las plantas control el patrón de acumulación viral fue similar al de las plantas M2, aunque en una de las tres plantas analizadas no encontramos CMV-24 en el ápice. En las hi de las plantas M2, respecto a las plantas GUS, las señales de hibridación estaban más extendidas por toda la hoja (Fig. 3.6). Estos resultados indicarían que el mayor contenido viral detectado en las plantas M2 sería debido a la existencia de un mayor nº de células infectadas y por tanto, que la expresión de la proteína pM2 facilita la infección viral tanto en la hoja inoculada como en el tejido sistémico de la planta.

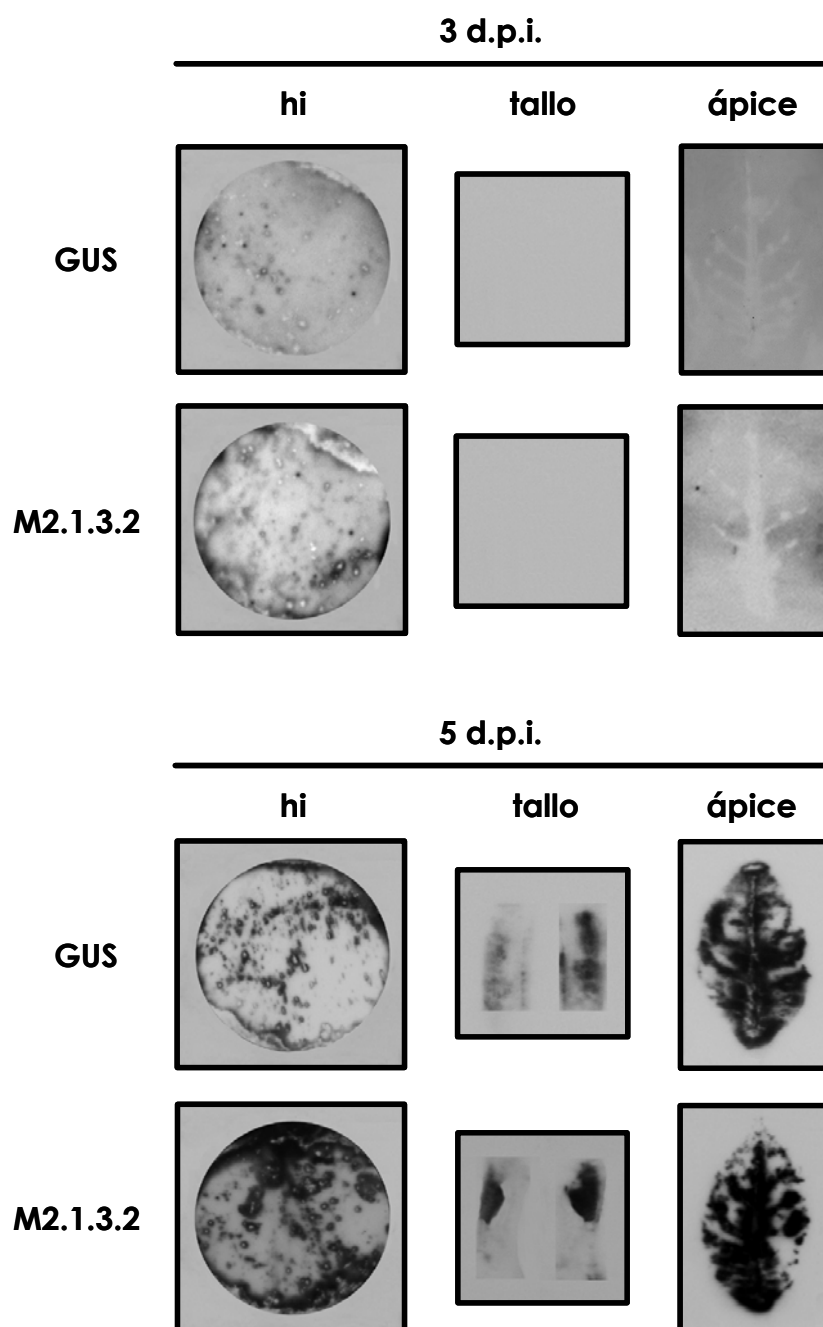


Fig. 3.6. Análisis de la distribución de los RNAs de CMV-24 en las hi, tallos y ápices de las plantas control GUS y M2.1.3.2 a los tiempos indicados en la figura. hi: hoja inoculada

3.2.- Caracterización de las plantas M3

3.2.1- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM3

Para determinar si la proteína pM3 expresada en plantas de tabaco mantiene la funcionalidad de la proteína p3a, es decir, si es capaz de complementar *in trans* el movimiento del virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn, llevamos a cabo experimentos de complementación en plantas M3 pertenecientes a la generación F1. Como describimos en el aptdo. 3.1.1, las plantas fueron seleccionadas en base a los niveles de acumulación de la proteína pM3. Así, analizamos el contenido del RNA M3 y de su correspondiente proteína, mediante ensayos de Northern y Western blot, utilizando sondas específicas del transgén y de la proteína 3a, en catorce plantas pertenecientes a cuatro líneas M3 diferentes: 9.4 (4 plantas), 28.2 (3 plantas), 35.5 (4 plantas) y 55.6 (3 plantas).

En todas las plantas M3 ensayadas detectamos el RNA M3 y su correspondiente proteína pM3. Ambos, RNA y proteína, poseían una movilidad electroforética mayor que la de los detectados en la planta 78, indicativa de su menor tamaño. En el caso del RNA, la señal de hibridación en las plantas M3.9.4 y M3.35.5 fue de mayor intensidad que en las plantas M3.55.6 y algunas plantas M3.28.2, donde la señal fue muy débil (Fig. 3.7).

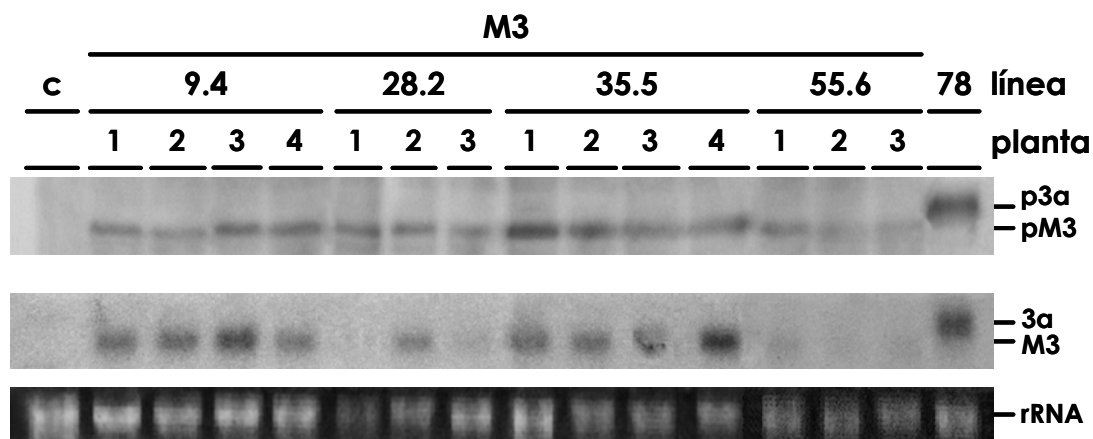


Fig. 3.7. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM3 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en plantas M3.9.4, M3.28.2, M3.35.5 y M3.55.6. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

Por otro lado, los niveles de acumulación de la proteína pM3 detectados en las plantas M3.55.6 y M3.28.2 fueron inferiores a los de las plantas de las otras dos líneas, si bien las diferencias encontradas en el contenido de las proteínas fueron menores que las observadas en los RNAs (Fig. 3.7).

En base a estos resultados, y para realizar los ensayos de complementación, seleccionamos las plantas M3.28.2.1 y M3.35.5.1 cuyos niveles de acumulación de la proteína pM3 eran intermedios y altos, respectivamente (Fig. 3.7). Como controles positivos y negativos usamos plantas 78 y GUS, respectivamente.

Tras la inoculación de las plantas con el virus CMV-Fny Δ Kpn, determinamos la cinética de acumulación de los RNAs virales en las hi a los 3, 5 y 7 d.p.i y en las hs (2ª y 3ª h.p.e.i.) a los 7 y 14 d.p.i, mediante ensayos de Northern-blot sobre los RNAs totales de las plantas y usando la ribsonda específica de la región 3'-NC de CMV-24.

En este ensayo, los RNAs virales detectados en las hi de las plantas GUS y de las dos plantas M3 analizadas alcanzaban su máxima acumulación a los 5 d.p.i., y a los 7 d.p.i. se producía una caída (Fig. 3.8). En las plantas 78, la acumulación de los mismos fue ascendente desde los 3 a los 7 d.p.i., y muy superior a los de las plantas GUS y M3 (Fig. 3.8).

La acumulación ascedente, entre los 3 y 5 d.p.i., de los RNAs virales en las hi de las plantas GUS y M3 reflejaría la replicación basal del CMV-Fny Δ Kpn en las células inicialmente inoculadas. Posteriormente, y en contraposición a lo que ocurre en las plantas 78, la ausencia de movimiento provocaría una caída en los niveles de acumulación viral. Estos datos serían indicativos de que la proteína pM3 no es capaz de complementar *in trans* el movimiento célula a célula del virus defectivo.

En las hs de las plantas GUS y M3 no detectamos el virus ni a los 7 ni a los 14 d.p.i., mientras que en las plantas 78, encontramos los RNAs virales en ambos tiempos y con niveles de acumulación ascendentes (datos no mostrados).

Estos resultados fueron corroborados mediante ensayos de hibridación en improntas de los tejidos superiores a las hi, no hallando CMV-Fny Δ Kpn ni en los peciolo de las hi, ni en el tallo, ni en las hojas sistémicas de las plantas GUS ni de las plantas M3. Por el contrario, en las plantas 78 encontramos el virus defectivo en todos los tejidos analizados (datos no mostrados).

El conjunto de estos resultados muestra que la proteína pM3 cuando se expresa constitutivamente en plantas de tabaco, independientemente de su nivel de acumulación y/o del nivel de acumulación del mRNA del transgén, no es capaz de

complementar el movimiento del virus CMV-Fny Δ Kpn, ni de célula a célula, ni a larga distancia.

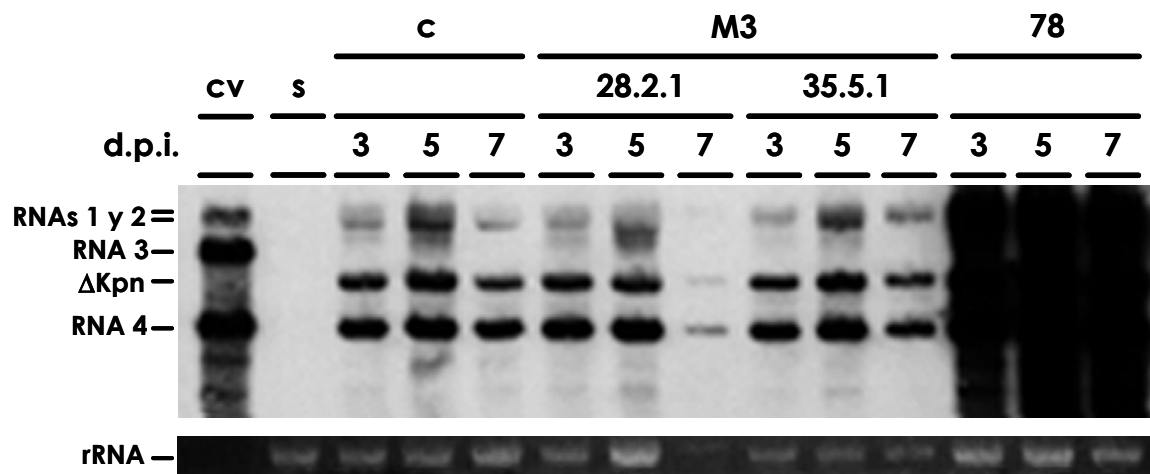


Fig. 3.8. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación de los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hi de las plantas control GUS (c), plantas M3.28.2.1 y M3.35.5.1, y plantas 3ª (78), a los tiempos indicados en la figura. Δ Kpn: RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn; cv: RNA de CMV-24 control; s: RNA total de planta control sana. Las posiciones de los RNAs 1, 2 y 3 se indican a la izquierda de la figura.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

3.2.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM3 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24

Hemos analizado el efecto que ejerce la expresión constitutiva de la proteína pM3 sobre la infección del virus homólogo en plantas de tabaco de once líneas M3 de la generación F0: 1, 9, 10, 28, 30, 35, 48, 55, 60, 67 y 69.

Para ello, inoculamos las plantas con CMV-24 y seguimos la infección viral mediante la observación de la sintomatología y la cuantificación de la carga viral en las hi y hs a los 7 y 14 d.p.i., mediante ensayos de ELISA-DAS (aptdo. 2.2.22 de M. y M.).

3.2.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En el 62,5% de las plantas control, los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, típicos de la infección mediada por CMV-24, aparecieron en la 2-3ª h.p.i. a partir del 5-7º d.p.i. El 37,5% restante, no desarrolló síntomas.

Todas las plantas M3 mostraron estos síntomas a los 7 d.p.i., pero de menor intensidad que los controles, especialmente las plantas de siete líneas M3(9, 10, 67, 28, 30, 35 y 48) donde se observó un moteado y aclaramiento de venas muy suave. Además, no los observamos en algunas plantas pertenecientes a las líneas 10 (25%), 1, 60 y 69 (37,5%), 9 (62,5%), 67 (87,5%) y 55 (100%).

A los 14 d.p.i., se acentuaron en el 62,5% de las plantas control y eran visibles a partir de la 4ª h.p.i. El 37,5% de estas plantas, al igual que ocurría a los 7 d.p.i., no desarrolló síntomas.

En este tiempo, las plantas de todas las líneas M3 mostraron síntomas de moteado y aclaramiento de venas y, en todos los casos, de menor intensidad que los controles, siendo especialmente débiles en las plantas M3.28 y M3.55. El 12,5% de las plantas M3.9 y M3.10 no los desarrolló.

3.2.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

En las hi de las plantas control, la acumulación viral determinada a los 7 y 14 d.p.i. fue de $65,32 \pm 10,71$ y $52,31 \pm 8,97$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente (Fig. 3.9).

En las hi de las plantas M3, encontramos unos niveles de carga viral heterogéneos (Fig. 3.9). Así, en cuatro líneas M3: 1, 35, 48 y 55, la carga viral a los 7 d.p.i. fue semejante a la determinada para las plantas control, aunque en el 25% de las plantas M3.55 no se detectó virus. A los 14 d.p.i., la concentración viral calculada en estas plantas fue superior a la control, acentuándose la diferencia en las plantas M3.35 ($140,83 \pm 10,09$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.9).

En las plantas M3.10 y M3.60, la concentración viral de las hi a los 7 d.p.i., fue inferior a la de las plantas control, siendo más significativa la diferencia en las plantas M3.60 ($22,43 \pm 3,60$ ng de virus/mg de tejido). Además, no hallamos virus en el 25% de las plantas M3.10. A los 14 d.p.i., encontramos CMV-24 en las hi de todas las plantas de ambas líneas, y con niveles inferiores a los determinados en las plantas control ($33,97 \pm 3,12$ y $39,41 \pm 3,01$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.9).

Hojas inoculadas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	65,32 ± 10,71	100	52,31 ± 8,97
1	100	73,93 ± 13,28	100	97,13 ± 17,41
9	100	189,18 ± 38,75	100	115,97 ± 23,39
10	75	31,93 ± 3,89	100	33,97 ± 3,12
28	100	124,29 ± 14,75	100	155,28 ± 11,37
30	100	96,78 ± 14,37	100	112,98 ± 6,27
35	100	70,31 ± 6,67	100	140,83 ± 10,09
48	100	67,81 ± 13,05	100	137,00 ± 9,94
55	75	91,33 ± 29,44	100	84,96 ± 18,48
60	100	22,43 ± 3,60	100	39,41 ± 3,01
67	37,5	88,64 ± 11,58	100	86,33 ± 16,30
69	100	166,09 ± 18,94	100	118,46 ± 17,58

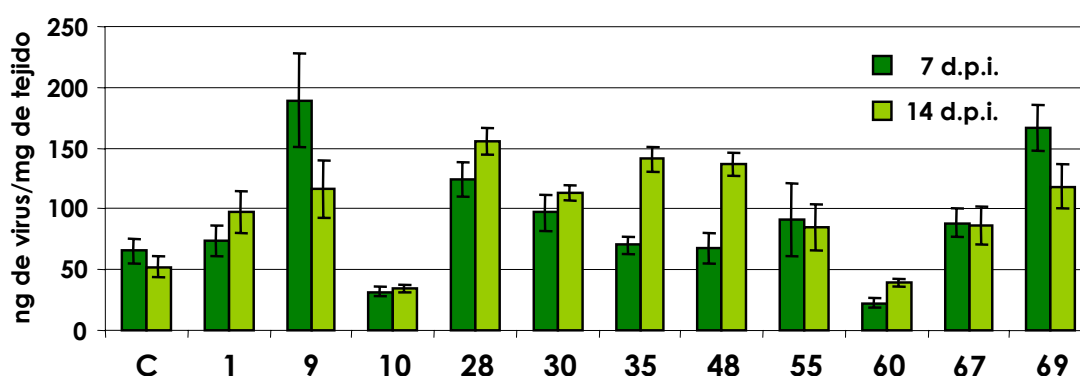


Fig. 3.9. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M3 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Finalmente, en las hi de las plantas de las cinco líneas M3 restantes: 9, 28, 30, 67 y 69, la carga viral a los 7 d.p.i. fue superior a la de las plantas control, siendo más acusada esta diferencia en las plantas M3.9 (189,18±38,75 ng de virus/mg de tejido) y

menos, en las plantas M3.67 ($88,64 \pm 11,58$ ng de virus/mg de tejido). Por otro lado, no detectamos el virus en el 62,5% de las plantas M3.67 (Fig 3.9). A los 14 d.p.i., las hi de todas las plantas de estas cinco líneas mostraron unos niveles de acumulación viral superiores a los de las plantas control, oscilando entre los $155,28 \pm 11,36$ ng de virus/mg de tejido de las plantas M3.28, y los $86,33 \pm 16,30$ ng de virus/mg de tejido de las plantas M3.67 (Fig 3.9).

3.2.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas M3, también observamos un comportamiento heterogéneo respecto a las plantas control (Fig. 3.10), que en algunos casos correspondía con el detectado en las hi. Las hs del 62,5% de las plantas control presentaban acumulaciones virales de $36,97 \pm 7,24$ y de $19,29 \pm 2,38$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i, respectivamente. No detectamos el virus en el resto de las plantas GUS analizadas.

A los 7 d.p.i, la carga viral en las hs de las plantas de las líneas M3: 9, 10 y 67 fue similar a la de las plantas control, no hallándose virus en el 37,5, 62,5 y 50% de las plantas M3.9, M3.10 y M3.67, respectivamente. A los 14 d.p.i., las hs de las plantas M3.10 mostraron también unos niveles de acumulación viral semejantes al control, a excepción de un 12,5% de las mismas donde no encontramos virus. Tampoco lo detectamos en el 12,5% de las plantas M3.67 y en el 75% de las plantas M3.9, mientras que en las plantas restantes de estas dos líneas, la acumulación viral fue superior a la control, variando entre $51,04 \pm 15,36$ y $106,80 \pm 25,10$ ng de virus/mg de tejido en las plantas M3.9 y M3.67, respectivamente (Fig. 3.10).

En algunas plantas M3.60, la concentración viral de las hs a los 7 d.p.i. fue inferior a la de las plantas control ($19,03 \pm 1,16$ ng de virus/mg de tejido) y además, en el 75% de las mismas no hallamos virus. A los 14 d.p.i., la carga viral en estas plantas fue semejante a la control, incrementándose hasta un 87,5% el porcentaje de plantas donde se detectó CMV-24 (Fig. 3.10).

Las hs de las plantas de cinco líneas M3 (1, 30, 35, 48 y 69) presentaron a los 7 d.p.i. tasas de acumulación viral superiores a los controles, acentuándose esta diferencia en las plantas M3.1 ($226,93 \pm 7,14$ ng de virus/mg de tejido). Encontramos virus en todas las plantas M3.1 y en el 87,5% de las plantas pertenecientes a las otras cuatro líneas. A los 14 d.p.i., también calculamos una carga viral superior a la control, así como en plantas de otras dos líneas M3: 28 y 55, acentuándose la variación en las

plantas M3.28 ($153,31 \pm 23,08$ ng de virus/mg de tejido). A este tiempo, encontramos el virus en el 12,5, 25 y 50% de las plantas M3.30, M3.69 y M3.55, respectivamente (Fig. 3.10).

Hojas sistémicas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	62,5	$36,97 \pm 7,24$	62,5	$19,29 \pm 2,38$
1	100	$226,93 \pm 7,14$	100	$83,47 \pm 11,99$
9	37,5	$54,37 \pm 21,84$	25	$51,04 \pm 15,36$
10	50	$47,70 \pm 6,73$	87,5	$21,75 \pm 2,21$
28	—	n.d.	100	$153,3 \pm 23,08$
30	87,5	$116,60 \pm 37,24$	87,5	$108,00 \pm 12,18$
35	87,5	$66,53 \pm 13,30$	100	$117,86 \pm 8,92$
48	87,5	$91,01 \pm 3,70$	100	$108,64 \pm 10,04$
55	—	n.d.	50	$119,48 \pm 9,76$
60	25	$19,03 \pm 1,16$	87,5	$16,51 \pm 1,11$
67	62,5	$44,13 \pm 7,53$	87,5	$106,80 \pm 25,10$
69	87,5	$171,68 \pm 21,03$	75	$102,95 \pm 19,74$

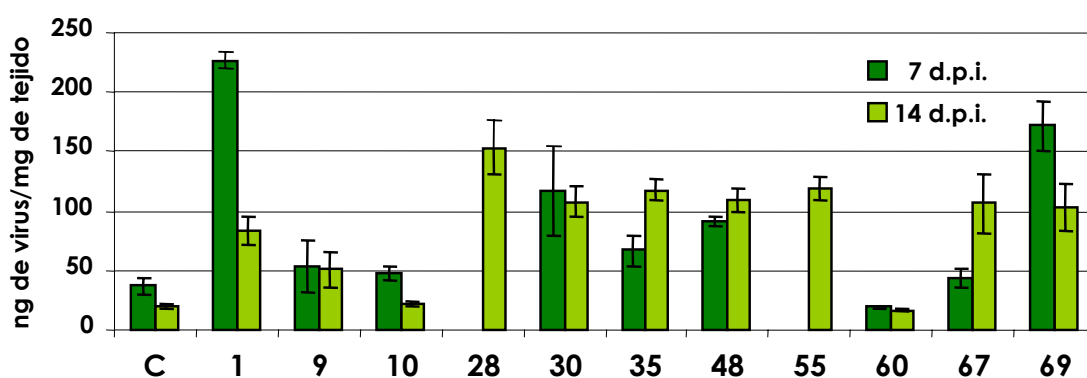


Fig. 3.10. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas sistémicas de plantas M3 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS. n.d.: no determinado.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Estos resultados mostraban que las diferentes líneas analizadas poseían varios tipos de comportamiento frente a la infección por el virus homólogo.

En las plantas de tres líneas M3 (28, 30 y 69) observamos mayores tasas de acumulación tanto en las hi como en las hs. En las hs de las plantas de otras cuatro líneas (1, 35, 48 y 55) también calculamos tasas de acumulación superiores. Sin embargo, los síntomas eran más suaves que los desarrollados por las plantas control, lo que podría ser indicativo de algún tipo de interferencia ejercida por la proteína pM3.

Por otro lado, en las plantas M3.9, a pesar de que la acumulación en las hi fue superior a la determinada en las plantas control, en el 75% de las mismas no encontramos virus en las hs ni a los 7, ni a los 14 d.p.i. Además, estas plantas no desarrollaron síntomas.

De igual forma, no encontramos virus en las hi y hs de un porcentaje variable de plantas M3.10, M3.60 y M3.67 en el primer tiempo analizado. Estas plantas o bien mostraron síntomas de menor intensidad que los control o bien no los desarrollaron.

3.2.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM3 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Analizamos el efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM3 frente a la infección de CMV-24 en la progenie de individuos que presentaron alguno de los comportamientos característicos de la generación F0: M3.9.3, M3.9.4, M3.28.2, M3.35.5, M3.35.7, M3.55.5 y M3.55.6.

En la planta M3.9.3, la carga viral de la hi a los 7 d.p.i. fue superior (131,02 ng de virus/mg de tejido) a la correspondiente control, aunque similar a los 14 d.p.i. (51,57 ng de virus/mg de tejido). El contenido viral de las hi de la planta M3.9.4 a ambos tiempos era similar a la de las plantas control (69,73 y 47,86 ng de virus/mg de tejido, respectivamente). En ninguna de estas dos plantas detectamos el virus en las hs, en ninguno de los dos tiempos analizados y tampoco desarrollaron síntomas a lo largo de la infección viral.

En la planta M3.28.2, el contenido viral de las hi a los 7 y 14 d.p.i fue superior al del control: 197,85 y 92,85 de virus/mg de tejido, respectivamente. En las hs no encontramos virus a los 7 d.p.i. mientras que, a los 14 d.p.i., la carga viral fue superior a la control (241,04 ng de virus/mg de tejido). A partir de los 7 d.p.i., esta planta desarrolló síntomas de moteado y aclaramiento de venas más suaves que los controles, y se mantuvieron a los 14 d.p.i.

En la planta M3.35.5, la acumulación viral en las hi a los 7 d.p.i. fue similar (64,58 ng de virus/mg de tejido) a la control aunque superior (159,52 ng de virus/mg de tejido) a los 14 d.p.i.. En las hs, la carga viral fue similar a la determinada en los controles en los dos tiempos analizados: 106,76 y 82,09 ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. Respecto al control, en la planta M3.35.7, calculamos en las hi y hs contenidos parecidos de virus a los 7 d.p.i. (61,82 ng de virus/mg de tejido y 38,419 ng de virus/mg de tejido, respectivamente), pero superiores a los 14 d.p.i. (197,89 ng de virus/mg de tejido y 139,38 ng de virus/mg de tejido, respectivamente). Además, en estas dos plantas M3.35, los síntomas de moteado y aclaramiento de venas aparecieron a los 14 d.p.i. y eran de mayor intensidad que los de las plantas GUS.

En la planta M3.55.5, no encontramos el virus en las hi a los 7 d.p.i., pero a los 14 d.p.i. la carga viral fue semejante a la de las plantas control (49,54 ng de virus/mg de tejido). En la planta M3.55.6, la carga viral determinada en las hi fue inferior (27,72 ng de virus/mg de tejido) y superior (83,61 ng de virus/mg de tejido) a la control a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. En ninguna de estas plantas hallamos virus en las hs. Además, no desarrollaron síntomas a lo largo de la infección viral.

3.2.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En las plantas control los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, aparecieron en la 2ª h.p.i. a partir del 5-7º d.p.i.. A este tiempo, en el 75% de las plantas M3.9.3 y en todas las plantas M3.9.4 y M3.35.5 observamos, a partir de la 2-3ª h.p.i., el mismo tipo e intensidad de síntomas que en las plantas GUS. El 25% de las plantas M3.9.3 no desarrolló síntomas. Por otro lado, las plantas de las cuatro líneas restantes (28.2, 35.7, 55.5 y 55.6) mostraron síntomas de moteado y aclaramiento de venas pero de menor intensidad que los controles.

A los 14 d.p.i., las plantas control mostraron síntomas más intensos a partir de la 3-4ª h.p.i. En la planta M3.35.7, observamos una sintomatología similar a partir de la 4ª h.p.i. mientras que las plantas de las seis líneas M3 restantes (9.3, 9.4, 28.2, 35.5, 55.5 y 55.6) desarrollaron los mismos síntomas pero de menor intensidad, a excepción de un 25% de las plantas M3.35.5, donde no los observamos.

3.2.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral determinada en las hi de las plantas control fue de $109,23 \pm 13,89$ y $142,27 \pm 19,35$ ng de virus/mg de tejido a los 7 d.p.i. y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.11).

En las plantas M3.9.3, y respecto al control, detectamos contenidos virales similares en las hi a los 7 d.p.i. ($102,72 \pm 10,51$ ng de virus/mg de tejido) e inferiores a los 14 d.p.i. ($85,83 \pm 8,97$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.11).

La carga viral determinada en las hi de las plantas de las líneas M3: 9.4, 35.5, 35.7 y 55.5 a los 7 d.p.i., fue inferior a la de las plantas control, siendo más dispar en las plantas M3.55.5 ($25,29 \pm 4,45$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.11). A los 14 d.p.i., todas las plantas mantuvieron este comportamiento y mostraron contenidos virales que oscilaban entre $51,50 \pm 7,58$ y $77,32 \pm 12,38$ ng de virus/mg de tejido para las plantas de las líneas M3.9.4 y M3.35.7, respectivamente. (Fig. 3.11).

Por el contrario, determinamos contenidos virales superiores a los de las plantas GUS en las hi de las plantas M3.28.2 y M3.55.6, a los 7 d.p.i.: $152,25 \pm 15,19$ y $160,43 \pm 7,41$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente (Fig. 3.11). A los 14 d.p.i., la carga viral de ambas sufrió una caída, siendo más acusada en las las hi de las plantas M3.28.2 ($87,86 \pm 14,89$ ng de virus/mg de tejido) que en las de las plantas M3.55.6 ($119,78 \pm 17,52$ ng de virus/mg de tejido) de forma que, a este tiempo post-infección, los niveles de acumulación fueron inferiores o similares a los de las plantas control, respectivamente. (Fig. 3.11).

Fig. 3.11. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de plantas M3 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

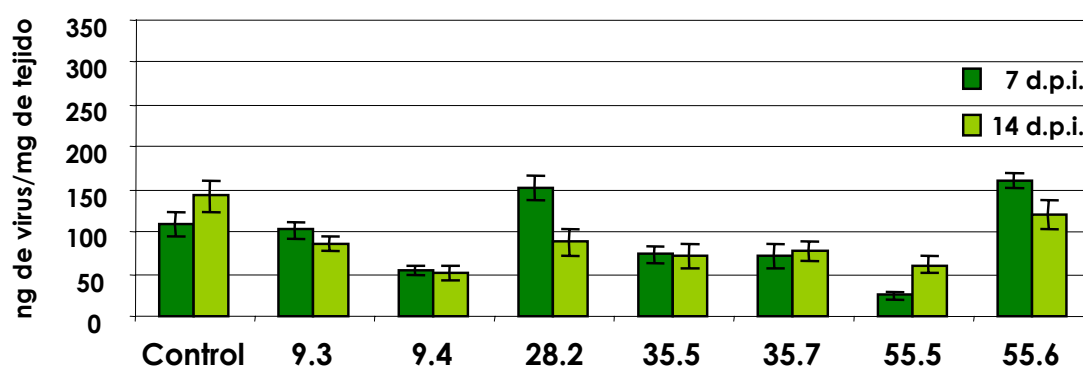
Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Hojas inoculadas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	109,23 ± 13,89	100	142,27 ± 19,35
9.3	100	102,72 ± 10,51	100	85,83 ± 8,97
9.4	100	54,42 ± 5,32	100	51,50 ± 7,58
28.2	100	152,25 ± 15,19	100	87,86 ± 14,89
35.5	100	73,31 ± 10,91	100	72,34 ± 14,47
35.7	100	72,52 ± 13,96	100	77,32 ± 12,38
55.5	100	25,29 ± 4,45	100	60,85 ± 10,38
55.6	100	160,43 ± 7,41	100	119,78 ± 17,52

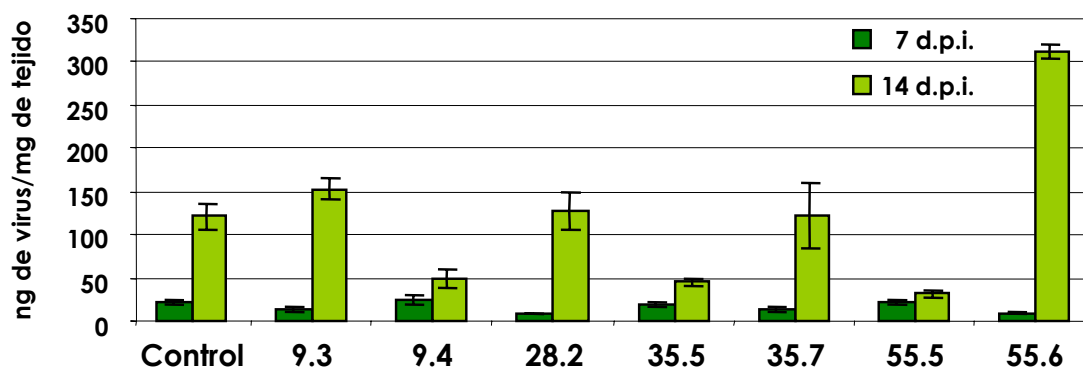


Hojas sistémicas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	20,93 ± 2,37	100	121,41 ± 14,65
9.3	100	13,56 ± 1,62	100	152,41 ± 11,87
9.4	100	25,27 ± 5,60	100	50,02 ± 10,98
28.2	100	8,93 ± 0,31	100	126,99 ± 22,18
35.5	100	20,15 ± 2,54	100	44,94 ± 3,58
35.7	100	14,01 ± 2,42	100	122,11 ± 38,69
55.5	100	22,06 ± 3,36	100	31,76 ± 3,32
55.6	100	9,25 ± 0,42	100	311,40 ± 8,55



3.2.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control hallamos cantidades de $20,93 \pm 2,37$ y $121,41 \pm 14,65$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.11).

En las plantas M3.9.4, M3.35.5 y M3.55.5, la carga viral de las hs a los 7 d.p.i., fue semejante a la control mientras que a los 14 d.p.i. fue inferior, siendo más acusada esta diferencia en las últimas ($31,76 \pm 3,32$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.11).

Finalmente, en las plantas M3.9.3, M3.28.2, M3.35.7 y M3.55.6 la concentración viral determinada a los 7 d.p.i. fue inferior a la control, siendo más dispar en las plantas M3.28.2 ($8,93 \pm 0,31$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., dicha acumulación se incrementó hasta alcanzar valores similares en las plantas M3.28.2 y M3.35.7, o superiores en las plantas M3.9.3 y M3.55.6 a los de las plantas control (Fig. 3.11).

Estos resultados son indicativos de que la expresión de la proteína pM3 produce una disminución de la carga viral en las hojas inoculadas de las plantas de cuatro de las líneas M3 analizadas (9.4, 35.5, 35.7 y 55.5), en ambos tiempos ensayados. Este mismo efecto se mantiene en las hs de tres de ellas (9.4, 35.5 y 55.5) a los 14 d.p.i..

Para determinar si el comportamiento diverso de las líneas estaba asociado a diferencias en el contenido de los RNAs M3, llevamos a cabo ensayos de Northern blot sobre el RNA total de plantas de diferentes líneas -utilizando una sonda DNA correspondiente a la región 5' del RNA 3 de CMV marcada radiactivamente-, y de Western blot a partir de los extractos proteicos -usando el anticuerpo específico de la proteína p3a-. Estos análisis (Fig. 3.12), que en parte se habían mostrado en la Fig. 3.7, revelaron que existían diferencias significativas en el contenido del RNA M3 de las distintas líneas analizadas, incluso entre plantas procedentes de la misma línea, y que existía una correlación entre los contenidos del RNA y de la proteína pM3. Así, los análisis del contenido del RNA M3 y de la proteína pM3 (Fig. 3.7 y 3.12) muestran que es superior en las plantas M3.9.4 y M3.35.5, donde la carga viral en las hi es menor a la control, e inferior en las plantas M3.28.2 y M3.55.6, donde la carga viral de las hi y hs no muestra diferencias significativas con respecto a las plantas control. Además de poner de manifiesto la variabilidad en las progenies de las plantas transgénicas, los resultados son indicativos de que las tasas de carga viral observadas en las plantas M3 dependen del contenido en el RNA y la proteína pM3.

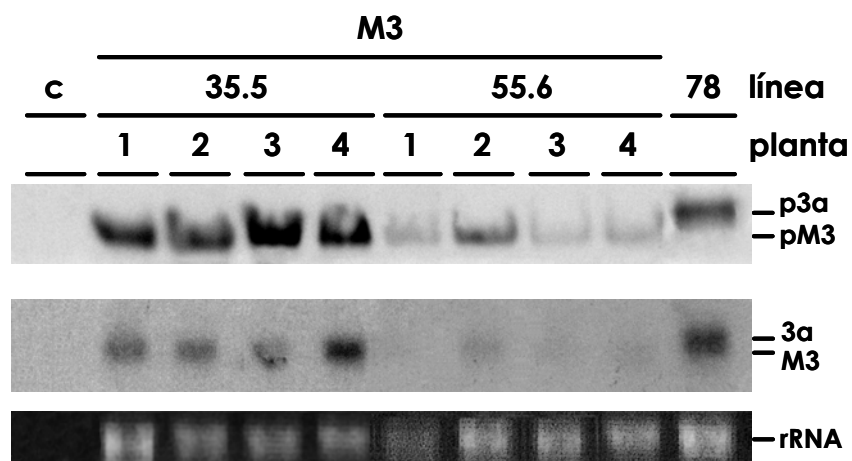


Fig. 3.12. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM3 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en plantas pertenecientes a las líneas M3.35.5 y M3.55.6. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados. En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

3.3.- Caracterización de las plantas M5

3.3.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína M5

Para determinar si las diferencias entre la proteína pM5 y p3a, consistentes en la delección de la región comprendida entre los aa 164 y 173 y en una sustitución conservativa E163D, afectaban a la funcionalidad de la proteína pM5, llevamos a cabo ensayos de complementación del mutante CMV-Fny Δ Kpn en plantas M5, como describimos anteriormente para las plantas M2 y M3.

En primer lugar, procedimos a examinar el contenido del RNA M5 y de su proteína en plantas M5 pertenecientes a cuatro líneas de la generación F1: 10.1, 48.3, 55.2 y 68.8. Como controles positivos y negativos de la expresión del gen 3a usamos plantas 3a (línea 78) y plantas GUS, respectivamente. Realizamos ensayos de Northern blot, en extractos de RNA, y de Western blot, a partir de extractos de proteínas totales, utilizando sondas de cDNA correspondientes al gen 3a e inmunosueros frente a su proteína, respectivamente.

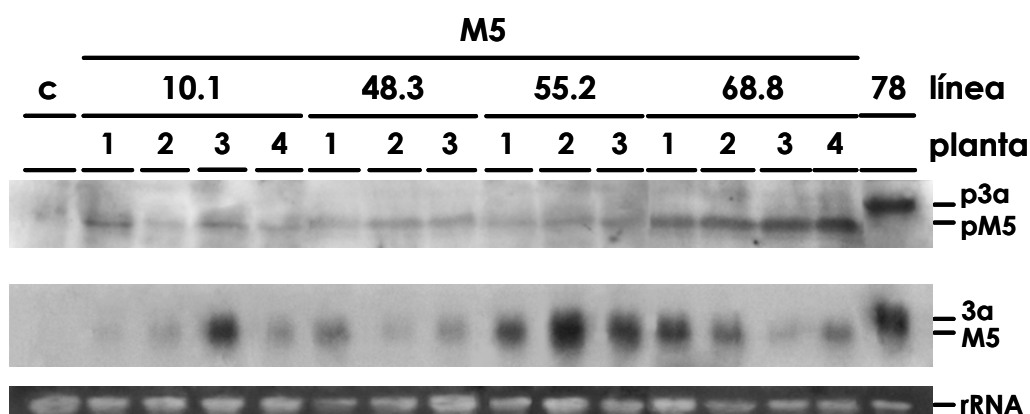


Fig. 3.13. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM5 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en las plantas M5.10.1, M5.48.3, M5.55.2 y M5.68.8. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

Estos análisis (Fig. 3.13) revelaron la presencia del RNA M5 y de la proteína pM5 en todas las plantas M5 ensayadas. En ambos casos, sus bandas de reacción tenían una mayor movilidad electroforética que las del RNA 3 y de la proteína p3a, indicando su menor tamaño. La intensidad de las señales de hibridación en el análisis de Northern

blot-indicativas del contenido del RNA- fue heterogénea en las plantas pertenecientes a las cuatro líneas analizadas, lo cual pone de manifiesto la variabilidad de las líneas. A rasgos generales, detectamos las señales de mayor intensidad en las plantas de la línea M5.55.2.

El contenido de proteína pM5, fue más homogéneo que el del RNA, si bien, en algunas plantas M5.68.8 fue algo superior al detectado en el resto de las líneas (Fig. 3.13). Estos resultados muestran a su vez que no existe una correlación entre los niveles de expresión del transgén y de la proteína pM5.

Para realizar los ensayos de complementación con el virus defectivo seleccionamos las plantas M5.10.1.4, M5.48.3.3 y M5.68.8.3, cuyos contenidos en proteína pM5 eran bajos, intermedios y altos, respectivamente (Fig. 3.13). Como controles negativos y positivos del análisis usamos plantas GUS y 78.

Tras la inoculación de las plantas con CMV-Fny Δ Kpn, seguimos la acumulación viral por análisis de Northern a partir de los RNAs totales extraídos de las hojas inoculadas a los 3, 5 y 7 d.p.i. y de las sistémicas a los 7 y 14 d.p.i. En estos ensayos detectamos la presencia de los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hi de todas las plantas ensayadas y en todos los tiempos analizados (Fig. 3.14 y datos no mostrados). En las plantas control GUS, la acumulación de los RNAs virales en las hi fue descendente entre los 3 y 7 d.p.i, si bien alcanzaba un máximo a los 5 d.p.i. Las plantas M5.48.3.3 y M5.68.8.3 mostraron un patrón de acumulación similar, mientras que en la planta M5.10.1.4 la acumulación fue descendente desde los 3 d.p.i. (Fig. 3.14). Por el contrario, la acumulación de los RNAs virales en las plantas 78 fue ascendente entre los 3 y 7 d.p.i. y muy superior a la presentada por las plantas M5 y GUS (Fig. 3.14 y datos no mostrados).

En los ensayos de Northern realizados a partir de los RNAs extraídos de las hs, de todas las plantas estudiadas sólo fue posible detectar la presencia de los RNAs virales en las plantas 78 en los dos tiempos analizados, y con una cinética de acumulación ascendente (datos no mostrados).

Estos resultados fueron corroborados mediante hibridación en improntas de las hojas inoculadas y sistémicas, de los tallos y los peciolo, tanto en las plantas control como en las plantas M5 (datos no mostrados).

El conjunto de estos resultados indica que la proteína pM5, independientemente de sus niveles de acumulación y/o de su mRNA, no es capaz de complementar *in trans* el movimiento de célula a célula del virus mutante defectivo.

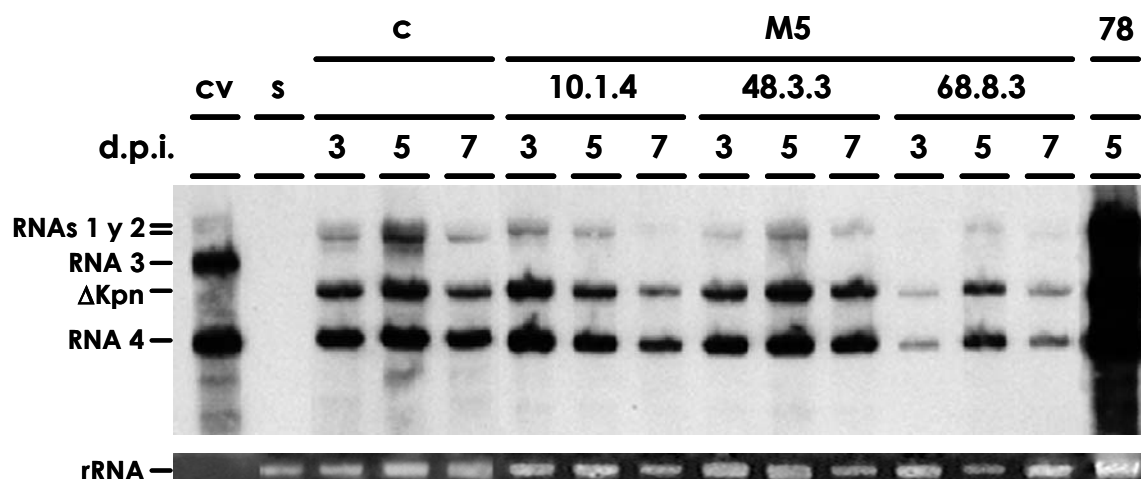


Fig. 3.14. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación de los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hi de las plantas control GUS (c), plantas M5.10.1.4, M5.48.8.8 y M5.68.8.3, y plantas 3a (78), a los tiempos indicados en la figura. Δ Kpn: RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn; cv: RNA de CMV-24 control; s: RNA total de planta control sana. Las posiciones de los RNAs 1, 2 y 3 se indican a la izquierda de la figura.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

3.3.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM5 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24

Hemos analizado el efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM5 sobre la infección viral, en trece líneas M5 de plantas de tabaco de la generación F0: 7, 9, 10, 11, 14, 20, 25, 26, 31, 48, 55, 65 y 68.

3.3.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

Tras la inoculación del virus, pudimos visualizar en la 2ª h.p.e.i. de las plantas control los síntomas típicos de la infección mediada por CMV-24 a partir del 5º-7º d.p.i.

A este tiempo, las plantas M5.25 desarrollaron una sintomatología similar a la control. En algunas plantas de siete de las líneas ensayadas no visualizamos los síntomas, en porcentajes variables: el 12,5%, de las plantas M5.31, el 25% de las plantas M5.14, el 50% de las plantas M5.9, el 75% de las plantas M5.26, y el 100% de las plantas M5.55, M5.10 y M5.11. El resto de las plantas de estas líneas desarrollaron moteado y aclaramiento de venas pero, en todos los casos, de menor intensidad que los controles. Además, en estas plantas, los síntomas se observaban a partir de la 3ª-4ª h.p.i., a excepción de las plantas M5.14 y M5.31, donde aparecían, al igual que en los

controles, a partir de la 2ª-3ª h.p.i. En las plantas de cinco de las líneas M5 (7, 20, 48, 65 y 68) los síntomas típicos de la infección, aparecieron a partir de la 2ª-3ª h.p.i. y, al igual que en las plantas anteriormente descritas, fueron de menor intensidad que los desarrollados por los controles.

A los 14 d.p.i., las plantas control desarrollaron síntomas más graves a partir de la 2ª-3ª h.p.e.i.

Las plantas M5.25 mostraban síntomas semejantes pero a partir de la 3ª-4ª h.p.e.i. Al igual que ocurría a los 7 d.p.i., no observamos síntomas en ninguna de las plantas M5.10 y M5.11, ni en algunas M5.9, M5.26 y M5.55, aunque en menor proporción que a los 7 d.p.i. Estos porcentajes oscilaban entre el 25% de las plantas M5.9 y M5.26 y el 37,5% de las plantas M5.55. El resto de las plantas pertenecientes a estas líneas desarrollaron síntomas de moteado y aclaramiento de venas a partir de la 5ª-6ª h.p.e.i. y de menor intensidad que los de las plantas control. Síntomas similares a éstos, visualizamos en las plantas M5.7, M5.14, M5.31 y M5.68 pero a partir de la 2ª-3ª h.p.e.i., y en las plantas M5.20 y M5.65 a partir de la 3ª-4ª h.p.e.i..

3.3.2.2.- Acumulación viral en hojas inoculadas

La carga viral determinada en las hi de las plantas control fue de $36,78 \pm 3,00$ y $67,06 \pm 7,91$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i, respectivamente.

Las hi de las plantas de cuatro de las líneas M5 ensayadas (7, 14, 31 y 48) contenían una carga viral comparable a los controles a los 7 d.p.i. (Fig. 3.15). A los 14 d.p.i., también fue semejante en las plantas M5.7, mientras que en las demás, fue algo menor.

A los 7 d.p.i., las plantas M5.26 mostraron una acumulación viral algo inferior a la control ($26,11 \pm 5,96$ ng de virus/mg de tejido) y no detectamos el virus en el 12,5% de las mismas. Sin embargo, a los 14 d.p.i., la carga viral alcanzaba valores semejantes a los control ($53,48 \pm 10,67$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.15).

Hojas inoculadas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	36,78 ± 3,00	100	67,06 ± 7,91
7	100	36,28 ± 4,59	100	62,85 ± 5,38
9	100	47,66 ± 6,76	100	68,04 ± 11,33
10	62,5	78,46 ± 17,76	100	n.d.
11	100	0	100	0
14	100	37,03 ± 4,60	100	53,14 ± 5,93
20	100	72,65 ± 15,89	100	66,58 ± 8,75
25	100	54,79 ± 7,72	100	60,12 ± 6,34
26	87,5	26,11 ± 5,96	100	53,48 ± 10,67
31	100	32,03 ± 3,36	100	50,36 ± 3,60
48	100	41,40 ± 4,71	100	50,73 ± 3,19
55	100	0	100	0
65	100	76,00 ± 15,39	100	55,40 ± 4,11
68	100	64,19 ± 12,12	100	109,21 ± 21,00

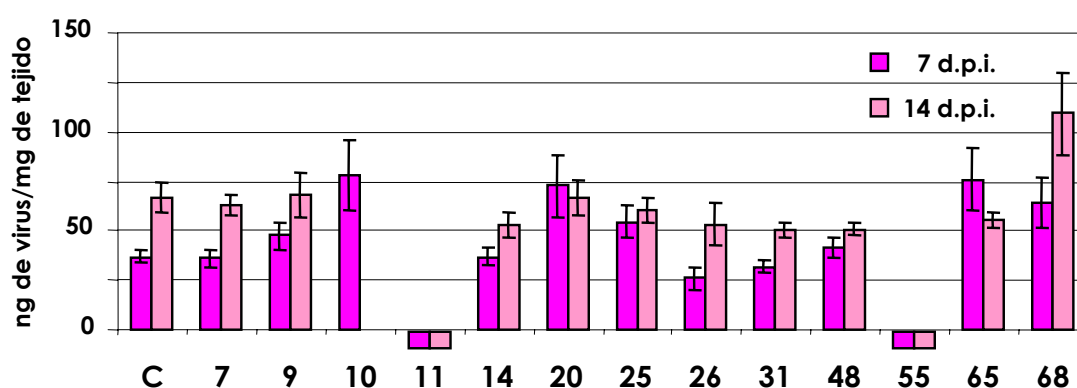


Fig. 3.15. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M5 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS; n.d.: no determinado.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

En la parte inferior del eje de abscisas se muestran las poblaciones donde no detectamos el virus en ninguno de sus individuos. Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

En plantas de seis líneas (9, 10, 20, 25, 65 y 68) la carga viral a los 7 d.p.i. fue superior a la control, siendo más significativa esta diferencia en el 62,5% de las plantas M5.10 ($78,469 \pm 17,765$ ng de virus/mg de tejido) aunque en el 37,5% de éstas no detectamos virus. A los 14 d.p.i., mantuvieron este comportamiento las plantas M5.68 ($109,21 \pm 21,00$ ng de virus/mg de tejido) mientras que en las plantas de las otras cuatro líneas (9, 20, 25 y 65) la acumulación viral fue semejante a la control (Fig. 3.15).

Finalmente, en el 100% de las plantas M5.11 y M5.55 no detectamos el virus en ninguno de los tiempos analizados.

3.3.2.3.- Acumulación viral en hojas sistémicas

La concentración viral determinada en las hs de las plantas control fue de $57,59 \pm 8,41$ y $30,65 \pm 4,049$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

En las hs de las plantas de seis líneas (7, 9, 20, 25, 48 y 68) –cuya carga viral en las hi era igual o superior a la control- calculamos contenidos virales similares a los control a los 7 y 14 d.p.i. (Fig. 3.16).

En todas las plantas M5.14 y M5.31 y en el 12,5% de las plantas M5.26, la carga viral encontrada a los 7 d.p.i. fue inferior a la control, siendo mayor la diferencia en las últimas ($10,07 \pm 0,00$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., la concentración viral fue semejante a la control en las plantas M5.14 y M5.31 (Fig. 3.16). Además, no detectamos el virus en el 87,5 y 100% de las plantas M5.26 a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

A los 7 d.p.i., la acumulación viral determinada en las plantas M5.65 fue superior ($100,570 \pm 145,401$ ng de virus/mg de tejido) a la control y, a los 14 d.p.i. semejante (Fig. 3.16).

Finalmente, en ninguna de las plantas de tres líneas M5 (10, 11 y 55) pudimos hallar el virus en estas hojas a los 7 d.p.i., único tiempo analizado.

Estos resultados muestran que en siete de las trece líneas de plantas M5 ensayadas, la expresión de la proteína pM5 interfiere con la infección del virus homólogo, de forma que se encuentra en concentraciones inferiores a la control o bien no se detecta en las hojas inoculadas y sistémicas de tres líneas (11, 26 y 55), en las hojas sistémicas de otras cuatro líneas (7, 10, 14, 31), y/o se produce una atenuación o supresión del desarrollo de los síntomas en todas ellas.

Hojas sistémicas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	57,59 ± 8,41	100	30,65 ± 4,04
7	100	45,80 ± 3,19	100	31,04 ± 4,57
9	100	56,75 ± 14,80	—	n.d.
10	100	0	—	n.d.
11	100	0	—	n.d.
14	100	25,95 ± 4,21	100	26,01 ± 2,02
20	100	60,27 ± 3,59	100	25,57 ± 1,15
25	100	71,40 ± 9,16	100	24,46 ± 1,86
26	12,5	10,07 ± 0,00	100	0
31	100	41,56 ± 4,10	0	27,51 ± 2,38
48	100	73,36 ± 9,79	100	38,05 ± 3,40
55	100	0	—	n.d.
65	100	100,57 ± 15,40	100	39,17 ± 13,39
68	100	55,45 ± 5,88	100	29,21 ± 2,57

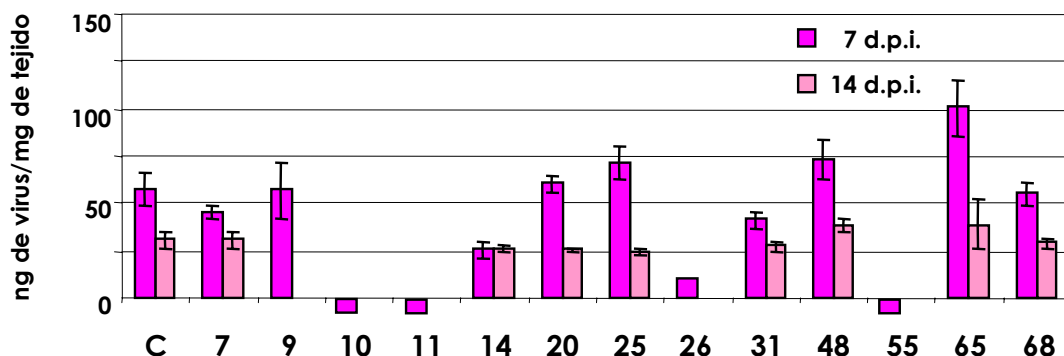


Fig. 3.16. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas sistémicas de plantas M5 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS; n.d.: no determinado.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

En la parte inferior del eje de abscisas se muestran las poblaciones donde no detectamos el virus en ninguno de sus individuos. Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.3.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM5 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Dada la heterogeneidad encontrada en plantas de la generación F0, seleccionamos diez de éstas para analizar en su progenie el efecto de la expresión constitutiva de la proteína M5 frente a la infección viral:

- M5.11.4, M5.11.6 y M5.55.2, que no desarrollaron síntomas a lo largo de la infección, y en las que no nos fue posible detectar CMV-24 en ningún tipo de hoja y en ninguno de los tiempos ensayados.

- M5.10.1 y M5.26.5, en las que únicamente detectamos el virus en las hi a los 7 y a los 14 d.p.i., respectivamente; y con una concentración semejante o inferior a la control (36,25 ng y 21,75 ng de virus/mg de tejido). Tampoco visualizamos síntomas a lo largo de la infección viral.

- M5.48.3, cuya acumulación viral en las hi fue superior (50,78 ng de virus/mg de tejido) e inferior (42,70 ng de virus/mg de tejido) a la control a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. Además, la carga viral determinada en las hs a los 2 tiempos analizados, fue similar a la control. Esta planta desarrolló los síntomas típicos de la infección, pero de menor intensidad que los observados en las plantas control y,

- M5.65.5 y M5.68.8, cuyos síntomas eran similares a los de las plantas control. En la primera, determinamos cargas virales superiores a la control tanto en la hi como en la hs (122,89 y 110,98 ng de virus/mg de tejido, respectivamente) a los 7 d.p.i.; mientras que a los 14 d.p.i. fueron inferiores (53,08 y 22,94 ng de virus/mg de tejido, respectivamente). En la segunda planta, la concentración viral en la hi, a los 7 y 14 d.p.i. fue mayor (108,55 ng de virus/mg de tejido) y menor (47,81 ng de virus/mg de tejido) respectivamente, que la de las plantas control, mientras que en las hs, fue similar a los 7 d.p.i. (56,59 ng de virus/mg de tejido) y superior a los 14 d.p.i. (36,93 ng de virus/mg de tejido).

3.3.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

El 64,3% de las plantas control GUS mostró los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, a partir de la 2ª h.p.e.i. y al 5º-7º d.p.i. Las plantas restantes no desarrollaron síntomas.

A este tiempo, en un porcentaje variable de plantas de las diferentes líneas ensayadas no observamos síntomas, a excepción de las plantas M5.11.6 y M5.26.5, en

las que en todas eran similares a los de las plantas control. Así, no desarrollaron síntomas el 12,5% de las plantas M5.48.3 y M5.55.2, el 37,5% de las plantas M5.10.1, M5.65.5, M5.68.8 y M5.11.6, y el 87,5% de las plantas M5.11.4 y M5.28.3. En las demás plantas pertenecientes a estas líneas los síntomas aparecieron a partir de la 2-3ª h.p.e.i. y fueron similares a los observados en los controles, a excepción del 50% de las plantas M5.17.6 y el 12,5% de las plantas M5.28.3, donde eran más atenuados.

A los 14 d.p.i., el 92,86% de las plantas control mostró síntomas más intensos a partir de la 5ª-6ª h.p.e.i. mientras que el 7,14% de las mismas no los desarrolló.

Al igual que ocurría a los 7 d.p.i., tampoco observamos síntomas en un porcentaje variable de plantas de las diferentes líneas M5, entre el 12,5% de las plantas M5.11.4, M5.26.5, M5.28.3 y M5.48.3, el 25% de las plantas M5.11.6, M5.17.6 y M5.55.2 y el 37,5% de las plantas M5.10.1 y M5.68.8. Las plantas restantes desarrollaron síntomas de moteado y aclaramiento de venas a partir de la 5ª-6ª h.p.e.i. sin embargo, mientras que en las plantas M5.17.6, M5.28.3, M5.65.5 y M5.68.8 fueron de intensidad similar, en las plantas M5.10.1, M5.11.4, M5.11.6, M5.26.5, M5.48.3 y M5.55.2 fueron más suaves que los control.

3.3.3.2.- Acumulación viral en hojas inoculadas

En las hi de las plantas control, establecimos cargas virales de $46,39 \pm 3,93$ y $48,51 \pm 5,90$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig 3.17).

En el primer tiempo analizado, las tasas de acumulación viral encontradas en las hi de las plantas de siete líneas (11.4, 11.6, 17.6, 26.5, 48.3, 55.2 y 65.5) eran menores que las de las hi de las plantas GUS, oscilando entre $21,00 \pm 1,21$ y $35,66 \pm 2,70$ ng de virus/mg de tejido para las líneas M5.17.6 y M5.26.5, respectivamente (Fig 3.17). A los 14 d.p.i., la carga viral de las hi de cinco de estas líneas M5 (11.4, 11.6, 17.6, 26.5 y 55.2) fue semejante a la control. No obstante, en el 12,5% de las plantas M5.55.2 no detectamos CMV-24. En las plantas de las dos líneas restantes: M5.48.3 y M5.65.5 fue superior a la de las plantas GUS ($61,50 \pm 10,40$ y $159,98 \pm 31,12$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente) (Fig 3.17).

Para las plantas M5.28.3, los niveles de acumulación viral calculados en las hi a los 7 d.p.i. fueron semejantes a los control mientras que, a los 14 d.p.i., se incrementaron respecto a éstos ($99,23 \pm 12,33$ ng de virus/mg de tejido) (Fig 3.17).

Por último, en las hi de las plantas de las líneas M5.10.1 y M5.68.8 calculamos una carga viral superior a la control, siendo más acusada la diferencia en las primeras

(164,69±22,15 ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., mantuvieron este comportamiento las plantas M5.68.8 (143,58±11,88 ng de virus/mg de tejido) mientras que, la concentración viral se igualó a la control en las plantas M5.10.1 (Fig 3.17).

3.3.3.3.- Acumulación viral en hojas sistémicas

En las hs de las plantas control, la acumulación viral calculada fue de 20,00±1,76 y 28,08±2,44 ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. Además, no detectamos el virus en el 12,5% de las mismas al primer tiempo analizado (Fig 3.17).

En las hs del 62,5% de las plantas M5.11.6 y del 87,5% de las plantas M5.48.3, la carga viral a los 7 d.p.i. fue menor que la control (17,30±0,71 y 13,88±2,22 ng de virus/mg de tejido, respectivamente). A los 14 d.p.i., también fue inferior en el 87,5% de las plantas M5.48.3 (19,19± 2,48 ng de virus/mg de tejido) mientras que en el 75% de las plantas M5.11.6 fue superior (28,74±1,86 ng de virus/mg de tejido). En el resto de las plantas, no hallamos CMV-24 (Fig 3.17).

En las hs de plantas de tres líneas, en porcentajes que variaban entre el 62,5% para la línea M5.28.3 y el 75% para las líneas M5.11.4 y M5.55.2 y, en todas las plantas M5.65.5, la concentración viral en estas hojas fue similar a la calculada para los controles a los 7 d.p.i., no hallándose CMV-24 en las plantas restantes. A los 14 d.p.i., todas las plantas M5.11.4 y M5.28.3 mostraron una carga viral semejante a la control mientras que, en este tiempo, en el 87,5% de las plantas M5.55.2 y M5.65.5, fue inferior (21,62±1,00 ng de virus/mg de tejido) y superior (52,54±17,81 ng de virus/mg de tejido) a la control, respectivamente. En el 12,5% de las mismas no encontramos el virus (Fig 3.17).

Fig. 3.17. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de las plantas M5 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

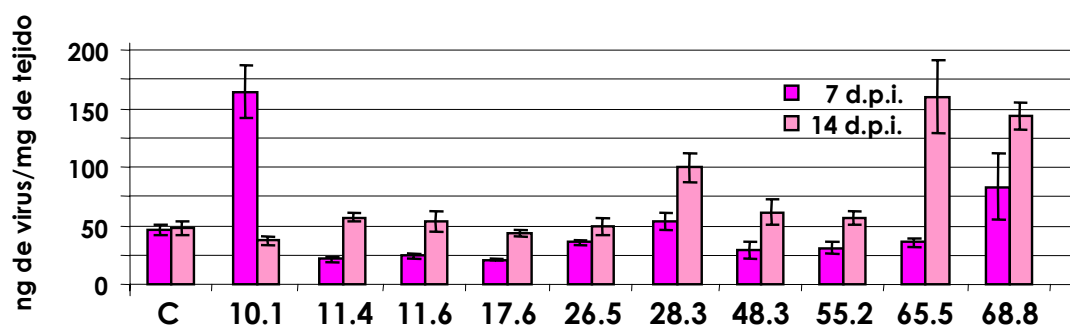
Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Hojas inoculadas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	46,39 ± 3,93	100	48,51 ± 5,90
10.1	100	164,69 ± 22,15	100	37,35 ± 3,45
11.4	100	21,11 ± 2,73	100	56,84 ± 3,51
11.6	100	24,11 ± 1,95	100	53,75 ± 8,71
17.6	100	21,00 ± 1,21	100	43,76 ± 2,78
26.5	100	35,66 ± 2,70	100	49,23 ± 7,55
28.3	100	53,49 ± 7,45	100	99,93 ± 12,33
48.3	100	28,91 ± 6,90	100	61,50 ± 10,40
55.2	100	31,17 ± 4,96	87,5	56,39 ± 5,91
65.5	100	35,59 ± 4,25	100	159,98 ± 31,12
68.8	100	83,31 ± 27,80	100	143,58 ± 11,88

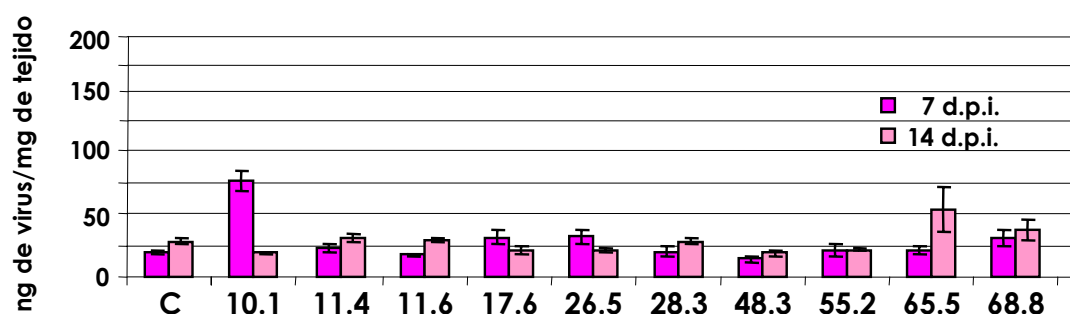


Hojas sistémicas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	87,5	20,00 ± 1,76	100	28,08 ± 2,44
10.1	87,5	75,75 ± 8,65	100	18,80 ± 0,82
11.4	75	22,18 ± 2,93	100	30,97 ± 3,13
11.6	62,5	17,30 ± 0,71	75	28,74 ± 1,86
17.6	62,5	31,40 ± 5,12	62,5	21,00 ± 3,51
26.5	100	31,87 ± 5,52	100	21,35 ± 1,43
28.3	62,5	19,90 ± 4,04	100	28,21 ± 2,90
48.3	87,5	13,88 ± 2,22	87,5	19,19 ± 2,48
55.2	75	20,81 ± 5,13	87,5	21,62 ± 1,00
65.5	100	20,80 ± 3,09	87,5	52,54 ± 17,81
68.8	50	30,13 ± 6,67	62,5	36,84 ± 7,67



Por último, en el primer tiempo analizado, las hs de algunas plantas de las cuatro líneas restantes: M5.10.1 (87,5%), M5.17.6 (62,5%), M5.26.5 (100%) y M5.68.8 (50%) presentaron unos niveles de acumulación viral superiores a los controles, siendo esta diferencia mínima en las plantas M5.68.8 ($30,13 \pm 6,67$ ng de virus/mg de tejido) y máxima en las plantas M5.10.1 ($75,75 \pm 8,65$ ng de virus/mg de tejido) (Fig 3.17).

A los 14 d.p.i., únicamente en el 62,5% de las plantas M5.68.8 encontramos una carga viral superior a la control ($36,84 \pm 7,67$ ng de virus/mg de tejido) mientras que, en las hs de todas las plantas M5.10.1 y M5.26.5 y en el 62,5% de las plantas M5.17.6 las tasas de acumulación viral fueron inferiores ($18,80 \pm 0,82$, $21,00 \pm 3,51$ y $21,35 \pm 1,43$, respectivamente). El resto de las plantas no acusaron la presencia de virus (Fig. 3.17).

Estos datos muestran que la expresión constitutiva de la proteína pM5 en plantas de tabaco de siete líneas M5 de la generación F1 interfiere con el proceso de la infección viral, provocando una caída en las tasas de acumulación del virus en las hi a los 7 d.p.i., de hasta el 50% respecto a los controles. Sin embargo este efecto no se mantiene a lo largo de la infección puesto que a los 14 d.p.i., no se observan diferencias significativas respecto a las plantas control. Por otro lado, también se aprecia una interferencia con el establecimiento de la infección sistémica que resulta en un porcentaje variable de plantas, superior al control, en las que no se detecta el virus ni a los 7 d.p.i. (11.4, 11.6, 17.6, 28.3, 55.2 y 68.8) y/o a los 14 d.p.i (11.6, 17.6, 48.3, 55.2, 65.5 y 68.8) y que no muestran síntomas. Este retraso a nivel sistémico puede ser la consecuencia de la interferencia ejercida en la hoja inoculada.

Por otro lado, las hi de las plantas de dos de las líneas ensayadas: M5.10.1 y M5.68.8 se desvían del comportamiento general ya que presentan una carga viral superior a la control que se refleja significativamente en las hs de las primeras, pero sólo a los 7 d.p.i.. Este hecho, podría ser debido a que las plantas de estas líneas en el momento de su inoculación estaban algo menos desarrolladas que las de las otras líneas, lo que conllevaría a una mayor susceptibilidad a la infección y una mayor tasa de acumulación viral, según el método de detección empleado.

3.3.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M5

En las hi y hs de las plantas M5.48.3 calculamos tasas de acumulación virales inferiores a las plantas control y, en algunas plantas de esta línea no detectamos el virus en el tejido sistémico (Fig. 3.17). Así, con el fin de determinar si este comportamiento iba asociado al establecimiento de un menor nº de focos de infección y para analizar el patrón de invasión viral en estas plantas, llevamos a cabo la detección del virus a los 3 y 5 d.p.i. en improntas de tejido (aptdo. 2.2.18 de M. y M.). Para ello, inoculamos la primera hoja desarrollada de cuatro plantas GUS y cuatro plantas M5.48.3 con CMV-24 y en cada uno de los tiempos ensayados, se analizaron dos plantas de cada línea. El RNA viral fue detectado con la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24.

A los 3 d.p.i., en las plantas M5 y GUS detectamos los RNAs virales sólo en las hi, aunque el nº e intensidad de los focos de infección en las plantas control fueron superiores a los detectados en las plantas M5 (Fig. 3.18).

A los 5 d.p.i., detectamos el virus en las hi, hs, tallo y ápice de ambos tipos de plantas. En las plantas M5 detectamos el virus en la 3ª h.p.e.i. mientras que, en las plantas GUS, estuvo presente a partir de la 2ª h.p.e.i. En la hoja inoculada de las dos plantas M5 ensayadas, el nº, intensidad y expansión de los focos de infección fueron inferiores a los determinados para los controles. (Fig. 3.18).

Estos datos indican que las menores tasas de acumulación viral encontradas en las plantas M5 son debidas a la presencia de un menor nº de células infectadas, como consecuencia de una inhibición de los procesos iniciales de la infección viral: replicación y/o movimiento, que a su vez se reflejan en una interferencia sobre la expansión sistémica.

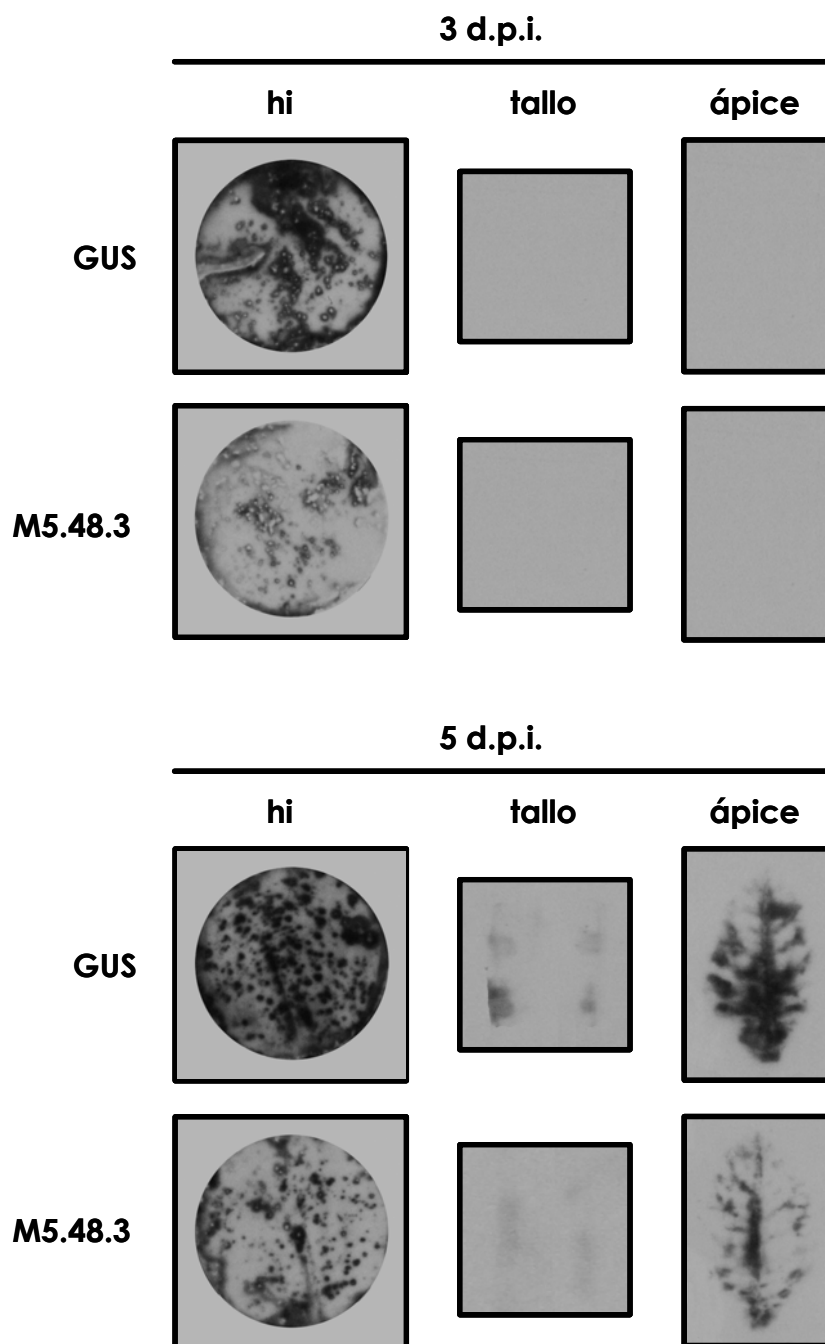


Fig. 3.18. Análisis de la distribución de los RNAs de CMV-24 en las hi, tallos y ápices de las plantas control GUS y de las plantas M5.48.3 en los tiempos indicados en la figura. hi: hoja inoculada.

3.4.- Caracterización de las plantas M6

3.4.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína M6

Con el fin de seleccionar plantas M6 para llevar a cabo ensayos de complementación con el mutante defectivo para el movimiento viral CMV-Fny Δ Kpn, analizamos el contenido de RNA M6 y de su proteína pM6 en once plantas pertenecientes a tres líneas M6 de la generación F1: 23.2, 32.3 y 55.4. Para ello, las preparaciones de RNA total y proteínas fueron analizadas mediante ensayos de tipo Northern y Western blot, usando sondas específicas del gen 3a y el anticuerpo específico para su proteína, respectivamente. En todas las plantas M6 detectamos el RNA M6 y su correspondiente proteína pM6, de mayores movilidades electroforéticas que las pertenecientes al transgén y a la proteína 3a de las plantas 78 utilizadas como control (Fig. 3.19). La diferencia de movilidad reflejaría las diferencias entre el gen M6 y 3a, consistentes en una delección de 30 nt entre los nt 619 y 648 del RNA 3 de CMV-24, y que codificaría una proteína con 10 aa deleccionados entre las posiciones 174 y 183. Como en casos anteriores, la acumulación del RNA y de su correspondiente proteína fue heterogénea entre plantas pertenecientes a una misma línea, y tampoco detectamos una correlación entre el contenido de proteína pM6 y el RNA M6. (Fig. 3.19).

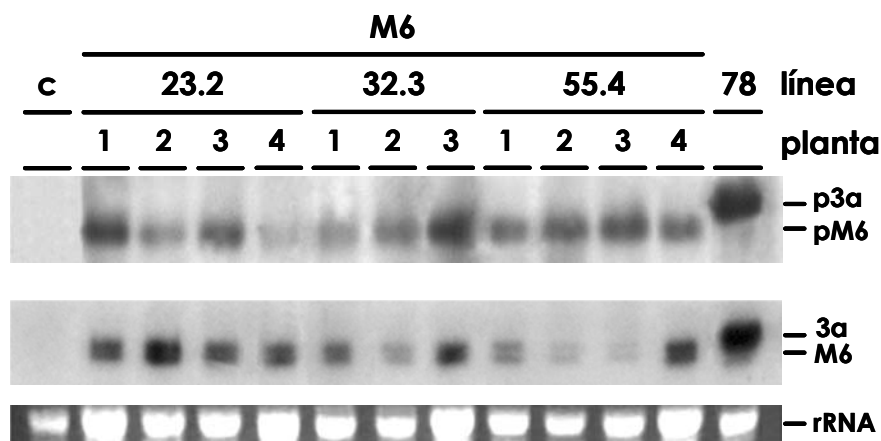


Fig. 3.19. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM6 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en plantas M6.23.2, M6.32.2 y M6.55.4. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

Con objeto de determinar si la proteína pM6 es funcionalmente activa para el movimiento viral, realizamos los ensayos pertinentes con el virus defectivo CMV-Fny ΔKpn. Así, utilizamos dos plantas M6.23.2 (plantas nº 2 y 3) y dos plantas M6.55.4 (plantas nº 1 y 2), cuyos contenidos en proteína M6 eran intermedios (Fig. 3.19). Como controles negativos y positivos de la complementación, usamos plantas GUS y 78, respectivamente.

Una vez inoculadas, analizamos la cinética de acumulación de la infección viral en las hi a los 3, 5 y 7 d.p.i. y en las hs a los 7 y 14 d.p.i., mediante ensayos de Northern blot, usando la ribsonda específica para la región 3'-NC de CMV-24 (Fig. 3.20). Debido a las diferencias de carga de RNA entre las distintas muestras, las señales de hibridación de cada una de ellas fueron cuantificadas densitométricamente y se normalizaron sobre los valores de absorbancias del rRNA 18S de las mismas.

En las plantas control GUS, la acumulación de los RNAs virales alcanzaba el máximo a los 5 d.p.i., pero descendía a los 7 d.p.i. (Fig. 3.20). Una cinética similar mostraron las plantas M6.23.2.3 y M6.55.4.1, mientras que en las plantas M6.55.4.2, se mantuvo la acumulación entre los 5 y los 7 d.p.i. Por último observamos una caída progresiva en el contenido de los RNAs de CMV-Fny ΔKpn entre los 3 y 7 d.p.i. en la planta M6.23.2.2.

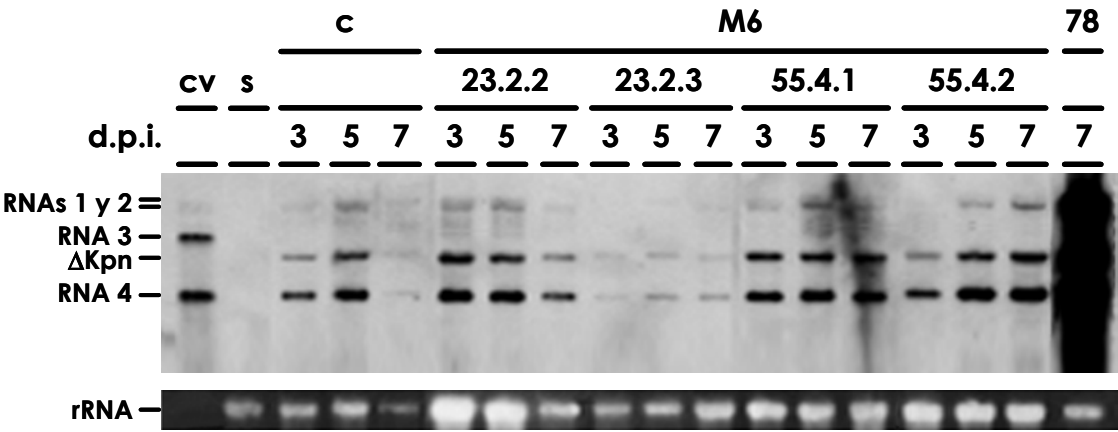


Fig. 3.20. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación de los RNAs de CMV-Fny ΔKpn en las hi de las plantas control GUS (c), plantas M6.23.2.2, M6.23.2.3, M6.55.4.1 y M6.55.4.2, y plantas 3a (78), a los tiempos indicados en la figura. ΔKpn: RNA 3 de CMV-Fny ΔKpn; cv: RNA de CMV-24 control; s: RNA total de planta control sana. Las posiciones de los RNAs 1, 2 y 3 se indican a la izquierda de la figura.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

Por el contrario, en las plantas 78, la acumulación de los RNAs virales fue ascendente y muy superior a la de las plantas GUS y M6 (Fig. 3.20 y datos no mostrados).

Por otro lado, no detectamos los RNAs virales en las hs de las plantas GUS y M6 en ninguno de los dos tiempos ensayados, si bien en las plantas 78, éstos se hallaron a los 7 y 14 d.p.i., con una cinética de acumulación ascendente (datos no mostrados).

El incremento observado en la acumulación de los RNAs virales en algunas plantas M6 y GUS entre los 3 y 5 d.p.i. puede deberse a la replicación del virus en las células inicialmente infectadas ya que, a los 7 d.p.i., la acumulación de los mismos no aumenta en ninguna de estas plantas, a diferencia de lo que ocurre en las plantas 78. Por ello, y del conjunto de estos resultados, podemos concluir que la proteína pM6 no es capaz de complementar *in trans* el movimiento célula a célula del virus CMV-Fny Δ Kpn.

3.4.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M6 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24

Para determinar si la expresión constitutiva de la proteína pM6 interfería con la infección del virus homólogo, hemos analizado quince líneas de plantas de tabaco M6 de la generación F0: 5, 10, 14, 23, 24, 25, 32, 33, 40, 47, 48, 54, 55, 58 y 64. Como controles, utilizamos plantas GUS. La infección viral fue seguida mediante la visualización de los síntomas y la cuantificación del virus en las hi y hs de las plantas a los 7 y 14 d.p.i..

3.4.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En el 50% de las plantas control los síntomas típicos de moteado y aclaramiento de venas, aparecieron en la 2-3ª h.p.i. a partir del 5-7º d.p.i. Las plantas restantes no desarrollaron síntomas a los 7 d.p.i..

A este tiempo, algunas plantas M6 tampoco mostraron síntomas, en porcentajes que variaban entre el 25% de las plantas M6.24 y el 100% de las plantas M6.14 y M6.55. Por otro lado, los síntomas observados en el resto de las plantas M6 eran de menor intensidad que los desarrollados por las plantas control.

A los 14 d.p.i., el 90% de los controles mostraban síntomas más prominentes a partir de la 3-4ª h.p.i.

Las plantas de cinco líneas M6 (5, 26, 47, 54 y 58) desarrollaron síntomas similares pero a partir de la 4ª h.p.i.. En las plantas de las diez líneas restantes, si bien encontramos algunas con la misma sintomatología, otras eran asintomáticas, en porcentajes que oscilaban entre el 12,5% de las plantas M6.14, M6.24 y M6.48 y el 75% de las plantas M6.33 y M6.55.

3.4.2.2.- Acumulación viral en hojas inoculadas

En las plantas control, la acumulación viral calculada en las hi a los 7 y 14 d.p.i. fue de $112,92 \pm 20,02$ y $137,33 \pm 17,19$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente. Detectamos el virus en el 66,67% y en el 100% de estas plantas a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.21).

En las hi del 62,5% y 37,5% de las plantas M6.24 y M6.32, la concentración viral a los 7 d.p.i. fue semejante a la determinada en las plantas control (Fig. 3.21). En las demás plantas no encontramos virus. A los 14 d.p.i., el contenido viral en las hi de todas las plantas M6.24 también fue similar al de los controles ($139,99 \pm 22,00$ ng de virus/mg de tejido) mientras que en el 62,5% de las plantas M6.32 fue inferior ($37,12 \pm 9,93$ ng de virus/mg de tejido). En el 37,5% de estas últimas no detectamos el virus (Fig. 3.21).

En las hi de plantas de nueve líneas (10, 14, 23, 25, 33, 40, 47, 48 y 55) la concentración viral en las hi a los 7 d.p.i. fue inferior a la control, alcanzando un valor mínimo en las plantas M6.40 ($16,83 \pm 1,60$ ng de virus/mg de tejido). Sin embargo, no hallamos el virus en el 62,5% de las plantas M6.14, M6.23 y M6.25 y en el 87,5% de plantas M6.55. A los 14 d.p.i., la carga viral en cuatro de estas nueve líneas (10, 14, 23 y 55) fue semejante a la control, mientras que en las plantas de las cinco líneas restantes (25, 33, 40, 47 y 48) fue inferior, oscilando entre $56,76 \pm 38,78$ y $69,17 \pm 12,85$ ng de virus/mg de tejido para las líneas M6.33 y M6.48, respectivamente. A diferencia de las plantas control, en algunas de estas plantas no detectamos virus: M6.23 (12,5%), M6.25 (25%), M6.33 (75%), M6.40 (37,5%), M6.48 (50%) y M6.55 (62,5%) (Fig. 3.21).

Finalmente, en las plantas de las cuatro líneas restantes (5, 54, 58 y 64) encontramos el virus en la hi únicamente a los 14 d.p.i.. En las plantas de tres de ellas (54, 58 y 64) la carga viral fue inferior a la control, acentuándose esta diferencia en las plantas M6.54 ($53,02 \pm 3,99$ ng de virus/mg de tejido). Sin embargo, las plantas M6.5 mostraron una acumulación viral semejante a la control (Fig. 3.21).

Hojas inoculadas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	66,67	112,92 ± 20,02	100	137,33 ± 17,19
5	100	0	100	117,10 ± 8,67
10	100	54,76 ± 11,31	62,5	119,98 ± 20,65
14	62,5	55,62 ± 4,33	100	160,75 ± 31,63
23	62,5	55,18 ± 5,69	87,5	115,43 ± 21,31
24	62,5	81,45 ± 17,74	100	139,99 ± 22,00
25	62,5	57,84 ± 5,30	75	66,64 ± 12,22
32	37,5	104,80 ± 16,83	62,5	37,12 ± 9,93
33	100	74,35 ± 16,12	25	56,76 ± 38,78
40	100	16,83 ± 1,60	62,5	66,59 ± 23,06
47	100	71,77 ± 12,22	100	94,60 ± 10,16
48	100	63,32 ± 5,43	50	69,17 ± 12,85
54	100	0	75	53,02 ± 3,99
55	12,5	41,45 ± 0,00	37,5	106,07 ± 29,48
58	100	0	100	88,28 ± 9,10
64	100	0	25	69,03 ± 2,40

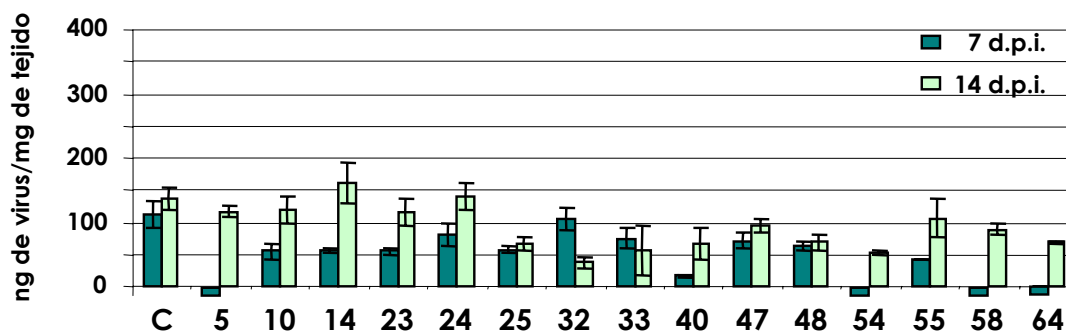


Fig. 3.21. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M6 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

En la parte inferior del eje de abscisas se muestran las poblaciones donde no detectamos el virus en ninguno de sus individuos. Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.4.2.3.- Acumulación viral en hojas sistémicas

La acumulación viral de las hs en el 42,86% y en el 62,96% de las plantas control fue de $57,43 \pm 12,11$ y $62,96 \pm 13,07$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. En el resto de las plantas no encontramos el virus (Fig. 3.20).

En plantas de cinco líneas M6 (10, 14, 24, 25 y 48) la carga viral alcanzada en estas hojas a los 7 d.p.i. fue similar a la control. El porcentaje de plantas en las que se encontró virus oscilaba entre el 25% de plantas M6.14 y el 62,5% de plantas M6.25 (Fig. 3.22).

A los 14 d.p.i., la tasa de acumulación viral se mantuvo semejante a la control en un porcentaje variable de plantas de cuatro de estas líneas: el 50% de M6.10, el 37,5% de M6.14, el 62,5% de M6.24 y el 87,5% de M6.25; mientras que en el 75% de las plantas M6.48 fue superior ($84,81 \pm 5,83$ ng de virus/mg de tejido). En el porcentaje restante de plantas no hallamos virus en este tiempo (Fig. 3.22).

A los 7 d.p.i., en el 25% de las plantas M6.64, los niveles de acumulación viral en las hs fueron inferiores a los de las plantas control ($34,08 \pm 5,82$ ng de virus/mg de tejido), pero superiores ($80,76 \pm 21,86$ ng de virus/mg de tejido) a los 14 d.p.i. (Fig. 3.20). En las demás plantas no detectamos el virus.

En plantas de seis líneas M6 (32, 33, 40, 47, 54 y 55) la carga viral calculada en las hs de un número variable de plantas a los 7 d.p.i. fue superior a la control, acentuándose esta diferencia en las plantas M6.40 ($253,90 \pm 41,00$ ng de virus/mg de tejido). Además, el porcentaje de plantas donde no hallamos virus varió entre el 16,66% de las plantas M6.47 y el 75% de las plantas M6.40 y M6.55 (Fig. 3.22). A los 14 d.p.i., mantuvieron este comportamiento las plantas de cinco de estas líneas (32, 40, 47, 54 y 55) siendo máxima la diferencia en el 25% de las plantas M6.40 ($300 \pm 0,00$ ng de virus/mg de tejido). Por otra parte, no detectamos CMV-24 en algunas plantas M6.32 (50%), M6.33 (62,5%), M6.40 (75%) y M6.55 (100%) (Fig. 3.22).

Finalmente, a los 7 d.p.i., no encontramos virus en las hs de ninguna de las plantas de tres líneas M6 (5, 23 y 58), y tampoco a los 14 d.p.i. en el 75 y el 25% de las plantas M6.23 y M6.58, respectivamente. El resto de estas plantas, así como todas las plantas M6.5, mostraron una concentración viral semejante ($106,63 \pm 21,72$ ng de virus/ mg de tejido) a la control (Fig. 3.22).

Hojas sistémicas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	42,86	57,43 ± 12,11	57,14	62,96 ± 13,07
5	100	0	100	106,63 ± 21,72
10	37,5	43,63 ± 2,00	50	72,32 ± 10,67
14	25	64,38 ± 6,20	37,5	76,66 ± 9,73
23	100	0	25	47,83 ± 6,84
24	50	59,71 ± 3,95	62,5	76,16 ± 11,95
25	62,5	66,76 ± 4,62	87,5	64,44 ± 5,47
32	37,5	106,25 ± 32,17	50	221,65 ± 48,19
33	75	160,73 ± 27,02	37,5	104,35 ± 42,68
40	25	253,90 ± 41,00	25	300,00 ± 0,00
47	83,34	87,81 ± 2,46	100	82,98 ± 22,04
48	37,5	67,50 ± 10,70	75	84,818 ± 5,83
54	75	86,47 ± 9,72	100	86,997 ± 2,03
55	25	163,25 ± 116,77	100	0
58	100	0	75	101,58 ± 20,84
64	25	34,08 ± 5,82	25	80,776 ± 21,86

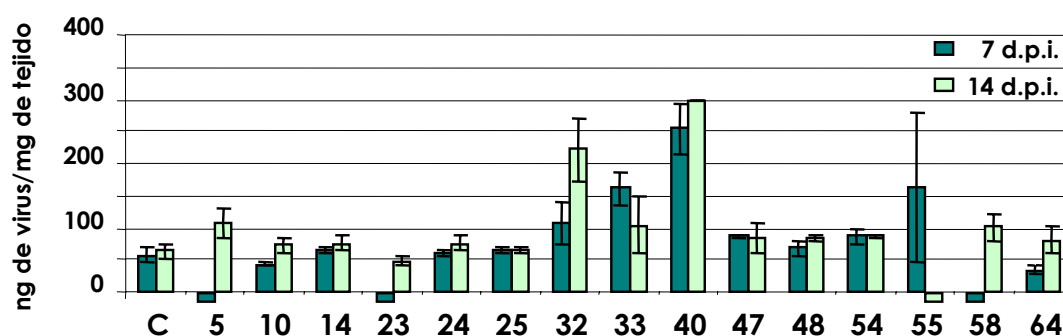


Fig. 3.22. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas sistémicas de plantas M6 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

En la parte inferior del eje de abcisas se muestran las poblaciones donde no detectamos el virus en ninguno de sus individuos. Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Este análisis no nos permite establecer fielmente el efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM6 sobre la infección viral puesto que las plantas control no se han infectado en su totalidad, debido posiblemente al estadio de desarrollo de las mismas. A pesar de la variabilidad encontrada en los datos, a rasgos generales, parece que la expresión de esta proteína produce un retraso inicial de la expansión viral en las hojas inoculadas de todas las líneas. Asimismo, en plantas de once líneas M6 (5, 10, 14, 23, 24, 32, 40, 48, 55, 58 y 64), también se produce una interferencia en la invasión sistémica debido a que un porcentaje elevado de las mismas -superior al encontrado en las plantas control- no se infectan, o bien presentan tasas de acumulación viral inferiores a las control en estas hojas al primer tiempo analizado. Además, estas plantas no desarrollaron síntomas.

3.4.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M6 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Con el fin de obtener datos más significativos sobre el efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM6 sobre la infección por el virus homólogo, hemos seleccionado cuatro plantas representativas del comportamiento general de las plantas M6 para analizarlo en su progenie.

Así, en la planta M6.23.2 la carga viral determinada en las hi a los 7 d.p.i. fue inferior (44,13 ng de virus/mg de tejido) a la control, y superior (167,36 ng de virus/mg de tejido) a los 14 d.p.i. Además, no detectamos el virus en las hs en ninguno de los tiempos analizados.

En la planta M6.23.3, la concentración viral en las hi a los 7 d.p.i. y 14 d.p.i fue inferior a la control: 45,50 y 81,16 ng de virus/mg de tejido, respectivamente. En las hs encontramos el virus sólo a los 14 d.p.i., siendo la carga viral inferior a la control (54,68 ng de virus/mg de tejido).

En la planta M6.32.3, sólo encontramos el virus a los 14 d.p.i.. Respecto a las plantas control, la carga viral fue inferior (18,89 ng de virus/mg de tejido) y superior (96,24 ng de virus/mg de tejido) en las hi y hs, respectivamente.

Ninguna de estas tres plantas desarrolló síntomas a los tiempos ensayados.

Finalmente, en la planta M6.55.4 no encontramos virus en ningún tipo de hoja y en ninguno de los tiempos analizados, así como tampoco síntomas a lo largo de la infección viral.

El seguimiento de la infección viral en la progenie se realizó por la visualización de los síntomas y la cuantificación del contenido viral en las hojas inoculadas y sistémicas a los 7 y 14 d.p.i., tras ser inoculadas con CMV-24.

3.4.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En las plantas control, los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, inducidos por la infección de CMV-24, se visualizaron en la 2ª h.p.e.i. a partir del 5-7º d.p.i. No obstante, la mitad de ellas no desarrolló síntomas.

En algunas plantas de la línea M6.23.2 (25%) y en todas las plantas M6.23.3 los síntomas eran indistinguibles de los controles. En el 100% y en el 50% de las plantas M6.32.3 y M6.55.4, respectivamente, observamos síntomas atenuados respecto a los controles, a partir de la 2-3ª h.p.e.i.. A este tiempo, no desarrollaron síntomas el 50% y el 75% de las plantas M6.55.4 y M6.23.2, respectivamente.

A los 14 d.p.i., el 87,5% de los controles mostraron síntomas más agudos a partir de la 3ª-4ª h.p.e.i. mientras que, en el 12,5% de las mismas no los observamos.

En algunas plantas de cuatro líneas M6 (23.2, 23.3, 40.5 y 55.4) observamos, a partir de la 3-4ª h.p.e.i., síntomas similares a los controles; en el resto de las plantas de estas líneas -el 37,5% de las plantas M6.23.2, M6.40.5 y M6.55.4 y el 12,5% de las plantas M6.23.3- no los visualizamos.

Finalmente, las plantas M6.32.3 desarrollaron síntomas de menor intensidad que las plantas control, a partir de la 3-4ª h.p.e.i.

3.4.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La carga viral determinada en las hi de las plantas control fue de $74,40 \pm 16,55$ y $83,98 \pm 10,60$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.23).

A los 7 d.p.i., la concentración viral fue semejante a la control en las plantas M6.23.3, mientras que en las plantas M6.23.2, M6.32.3 y M6.55.4 fue inferior. Por otro lado, el análisis de la carga viral en las plantas M6.23.2 arroja un alto error estándar, indicativo de la heterogeneidad del comportamiento de las mismas frente a la infección viral. Así, en esta línea encontramos plantas donde la acumulación viral es semejante a la control y plantas donde es menor (Fig. 3.23). A los 14 d.p.i., los niveles de acumulación viral determinados para las plantas de tres líneas M6 (23.2, 23.3 y 55.4) fue semejante a la control mientras que, en las plantas M6.32.3 fue algo superior ($114,89 \pm 22,55$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.23).

3.4.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control calculamos tasas de acumulación virales de $63,33 \pm 17,32$ y $65,17 \pm 3,81$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.23).

A los 7 d.p.i., determinamos contenidos virales semejantes en las líneas M6.23.3 y M6.32.3. A los 14 d.p.i., la carga viral en las plantas M6.23.3 se mantuvo similar a la control ($59,41 \pm 3,94$ ng de virus/mg de tejido) pero fue superior en las plantas M6.32.3 ($85,23 \pm 16,67$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.23).

En las plantas de las otras dos líneas M6 (23.2 y 55.4), la carga viral encontrada en las hs a los 7 d.p.i. fue inferior a la control ($33,87 \pm 10,75$ y $34,77 \pm 4,34$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente) (Fig. 3.23). A los 14 d.p.i., las plantas M6.55.4 mantenían una concentración viral algo inferior ($57,11 \pm 3,99$ ng de virus/mg de tejido), mientras que la de las plantas M6.23.2 fue semejante a la control ($63,61 \pm 2,08$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.23).

Para corroborar estos datos llevamos a cabo un segundo experimento en el que las plantas de estas cuatro líneas mostraron comportamientos similares a los obtenidos en el primero.

Fig. 3.23. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de plantas M6 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus.; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

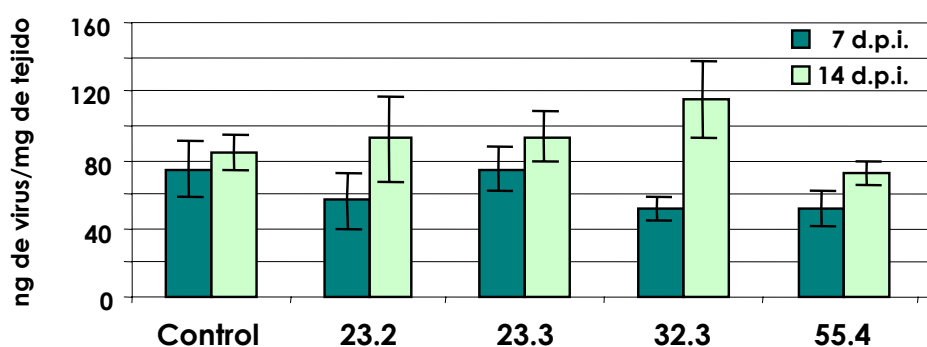
Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma

Hojas inoculadas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	74,40 ± 16,55	100	83,98 ± 10,60
23.2	100	56,48 ± 16,31	100	92,07 ± 25,53
23.3	100	74,58 ± 13,40	100	93,71 ± 14,44
32.3	100	51,23 ± 6,57	100	114,89 ± 22,55
55.4	100	51,47 ± 9,76	100	72,66 ± 7,02

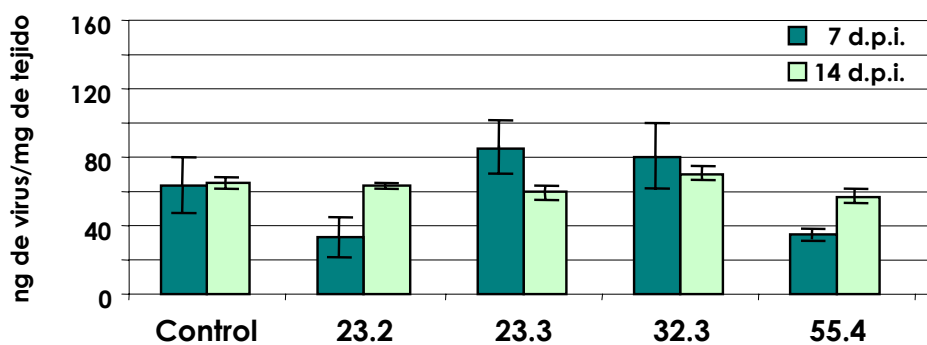


Hojas sistémicas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	63,33 ± 17,32	100	65,17 ± 3,81
23.2	100	33,87 ± 10,75	100	63,61 ± 2,08
23.3	100	85,23 ± 16,67	100	59,41 ± 3,94
32.3	100	79,39 ± 20,62	100	70,75 ± 3,76
55.4	100	34,77 ± 4,34	100	57,11 ± 3,99



Estos resultados indican que la expresión constitutiva en plantas de tabaco de la proteína pM6, interfiere con la acumulación del virus en las hi en tres de las cuatro líneas F1 ensayadas: en algunas plantas M6.23.2, y en todas las plantas M6.32.3 y M6.55.4, manifestándose en unas tasas de inhibición del contenido viral medio de hasta el 31% a los 7 d.p.i.. No obstante, a los 14 d.p.i., las cargas virales en estas hojas son semejantes e incluso algo superiores a las plantas control. Por otro lado, en la invasión sistémica se observa este mismo efecto en plantas de dos de estas tres líneas M6 (23.2 y 55.4), donde la carga viral determinada a los 7 d.p.i. es inferior a la control, acusándose tasas de inhibición del 46,5%. Sin embargo, al igual que ocurría en las hi, a los 14 d.p.i., la acumulación viral en estas hojas llega a ser muy similar a la alcanzada en las plantas control.

Por último, en las hs de las plantas M6.32.3 no detectamos una interferencia con la acumulación viral, a pesar de haberla encontrado en las hi, si bien observamos síntomas atenuados respecto a los controles, lo que podría atribuirse a una interferencia con la invasión del huésped en estadíos iniciales de la infección.

3.4.4. Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M6

Con el fin de determinar si la menor carga viral hallada en las hi de algunas plantas M6.23.2 y de las plantas M6.55.4 así como en las hs de todas ellas, iba asociada al establecimiento de un menor nº de focos de infección y/o a una menor expansión viral, llevamos a cabo la detección de CMV-24 a los 3 y 5 d.p.i. en improntas de tejido (aptdo. 2.2.18 de M. y M).

Para ello, inoculamos con CMV-24 la primera hoja desarrollada de cuatro plantas GUS y de ocho plantas M6 de forma que, en cada tiempo, analizamos dos plantas por línea (GUS, M6.23.2 y M6.55.4). El RNA viral fue detectado con la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24.

A los 3 d.p.i., en las plantas M6 y GUS detectamos los RNAs virales únicamente en las hi, aunque el nº y expansión de los focos de infección en las plantas GUS eran superiores a los de las plantas M6 (Fig. 3.24).

A los 5 d.p.i., encontramos el virus en las hi, hs, tallo y ápice de ambos tipos de plantas. En las hi de las plantas M6, observamos que el tamaño y nº de los focos de infección eran menores que los encontrados en las correspondientes hojas de las plantas GUS (Fig. 3.24). En las hs de las plantas control, el RNA viral fue hallado en la 2ª y 3ª h.p.e.i., mientras que en las plantas M6 únicamente en la 3ª h.p.e.i. (datos no

mostrados). Finalmente, las señales de hibridación encontradas en los tallos y ápices de las cuatro plantas M6 fueron de menor intensidad que las determinadas en las plantas GUS (Fig. 3.24 y datos no mostrados).

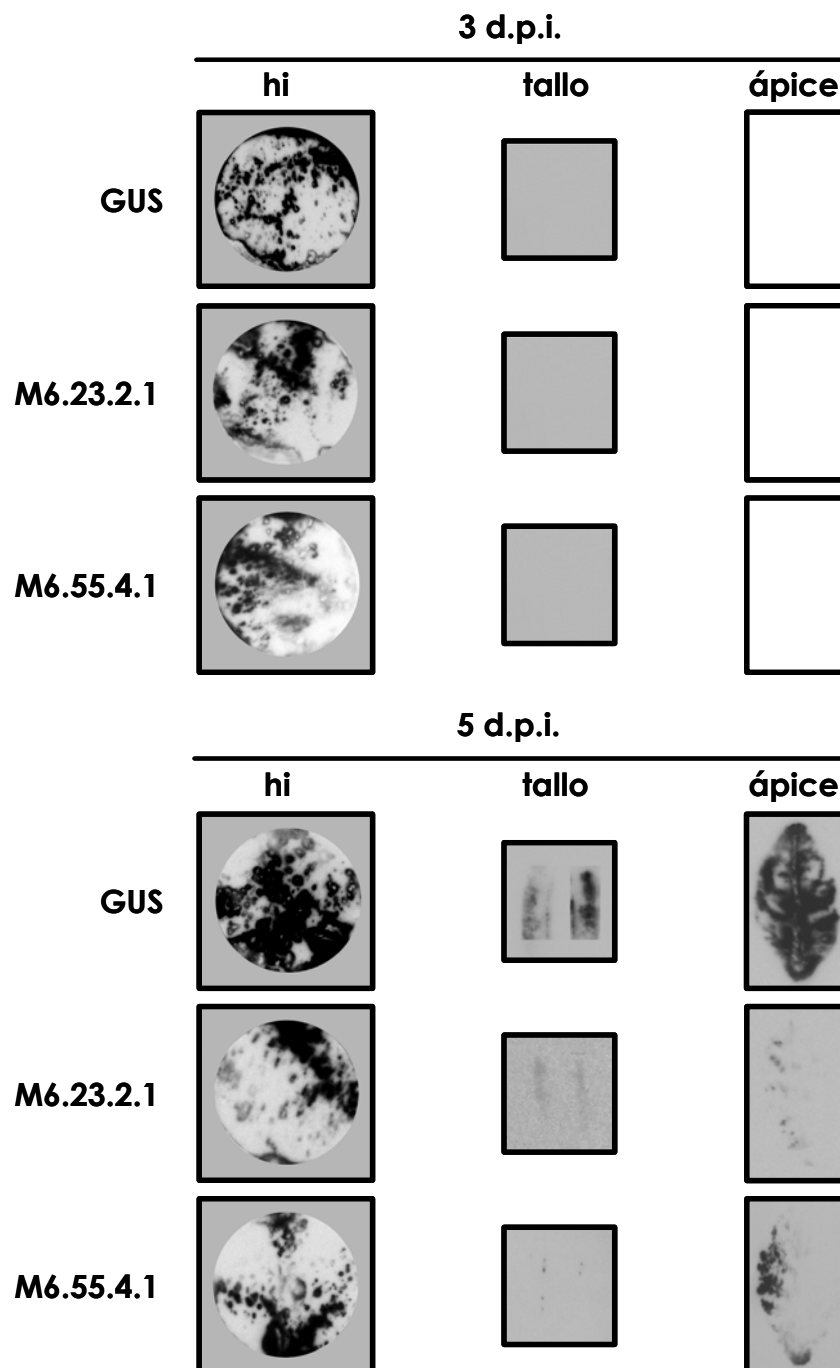


Fig. 3.24. Análisis de la distribución de los RNAs de CMV-24 en las hi, tallos y ápices de las plantas control GUS y de las plantas M6.23.3.1 y M6.55.4.1 en los tiempos indicados en la figura. hi: hoja inoculada

Estos resultados muestran que la expresión de la proteína pM6, conlleva un bloqueo de la infección local y un retraso en la infección sistémica del virus unida a una menor acumulación viral en los tallos de las plantas infectadas. Además, indican que las menores tasas de acumulación encontradas responden a un menor nº de focos de infección y, por tanto, su acción se tendría lugar interfiriendo con los procesos de movimiento y/o replicación.

3.5.- Caracterización de las plantas M8

3.5.1.- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM8

Con el fin de determinar si la proteína pM8 expresada en las plantas de tabaco es funcional para el movimiento de CMV-Fny Δ Kpn, seleccionamos dos líneas de plantas M8 correspondientes a la generación F1: 6.8 y 48.6.

Como en los experimentos similares realizados con las líneas anteriormente descritas, en primer lugar analizamos los niveles de acumulación del RNA M8 y de la proteína pM8 en cuatro plantas M8.6.8 y cuatro plantas M8.48.6. Usamos plantas 78 y GUS como individuos control. Mediante ensayos de Northern blot e inmunodetección, detectamos el RNA M8 y la proteína pM8 en todas las plantas M8 ensayadas y, en ambos casos, poseían una mayor movilidad electroforética que los de la línea 78 –que expresa constitutivamente el gen de la proteína 3a– reflejando su menor tamaño (Fig. 3.25). Por otro lado, observamos que los niveles de acumulación del RNA M8 y la proteína pM8 en las plantas M8.6.8 eran superiores a los encontrados en las plantas M8.48.6.

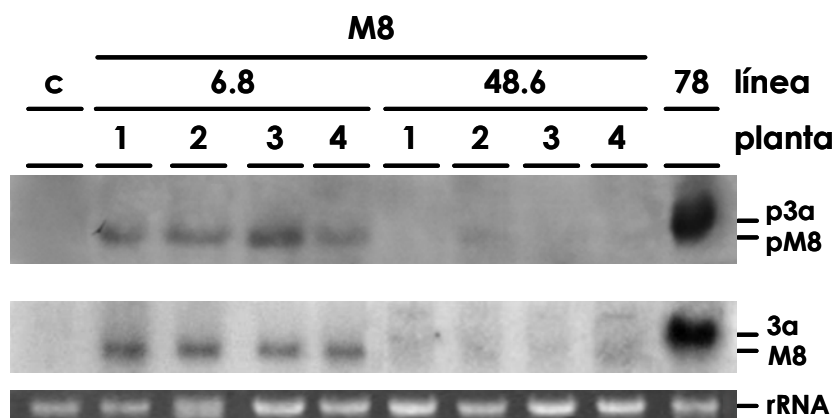


Fig. 3.25. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM8 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en las plantas M8.6.8 y M8.48.6. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

Para llevar a cabo los ensayos de complementación, seleccionamos las plantas nº 1 y 2 de la línea M8.6.8, cuyos contenidos en proteína pM8 eran intermedios y las plantas nº 1 y 3 de la línea M8.48.6 en las que la presencia de la proteína pM8 era

difícilmente detectable (Fig. 3.25). Como controles negativos y positivos de la complementación utilizamos dos plantas GUS y dos plantas 78, respectivamente.

Una vez inoculadas con el mutante CMV-Fny Δ Kpn, determinamos la cinética de acumulación de los RNAs virales a partir de los extractos de RNA total, en las hi a los 3, 5 y 7 d.p.i. y en las hs (2ª y 3ª h.p.e.i) a los 7 y 14 d.p.i., mediante ensayos de Northern blot utilizando la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24.

En las plantas GUS no detectamos los RNAs del virus defectivo en ningún tipo de hoja a los diferentes tiempos ensayados. Por el contrario, los detectamos en todas las hi de las plantas M8 con acumulaciones ascendentes, alcanzando el máximo a los 7 d.p.i.. También se encontraban en las hs de la planta M8.48.6.1 desde los 7 d.p.i. (datos no mostrados). En las plantas 78, los hallamos tanto en las hi como en las hs en todos los tiempos analizados. En estas plantas, en ambos tipos de hojas, la acumulación de los RNAs virales fue muy superior a la de las plantas M8 y también presentaban cinéticas ascendentes (datos no mostrados).

El aumento progresivo del contenido de los RNAs virales en las hi, así como su presencia en las hs de una de las plantas M8 indicaba que la proteína pM8 puede complementar *in trans* el movimiento del virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn.

Para confirmar estos resultados hicimos un segundo experimento en el que utilizamos seis plantas M8.48.6 (plantas nº 5-10). En todas ellas detectamos el RNA M8 y su proteína pM8 (Fig. 3.26 A). El contenido en de ambos fue heterogéneo entre los distintos individuos, siendo la cantidad de proteína pM8 superior en la planta nº 8.

Para corroborar la secuencia del transgén M8, llevamos a cabo la amplificación, mediante RT-PCR, de los RNAs derivados de los transgenes de las plantas M8 y 78, utilizando los cebadores 131 y 130 (aptdos. 2.1.5, 2.2.13 y 2.2.14 de M. y M.). El análisis electroforético de los productos de reacción (Fig. 3.26 B) reveló la presencia de una banda de DNA de 976 pb en la muestra de la planta 78, que corresponde al transgén 3a y una banda de 940 pb en las muestras de las seis plantas M8.48.6, que poseían a su vez la misma movilidad electroforética. La amplificación de los RNAs de la plantas GUS no originó ninguna banda, indicando la especificidad de la reacción. A continuación, establecimos la secuencia nucleotídica de dos de estas bandas (que correspondían a las plantas nº 6 y 9). Su análisis mostró que ambas correspondían a secuencias M8, y contenían la delección de 36 nt en la ORF 3a, desde los nt 671-706 del RNA 3 de CMV-24 y la sustitución C670T que no alteraba el aa codificado por el triplete: AAC-AAT →Asn 191 en la proteína p3a.

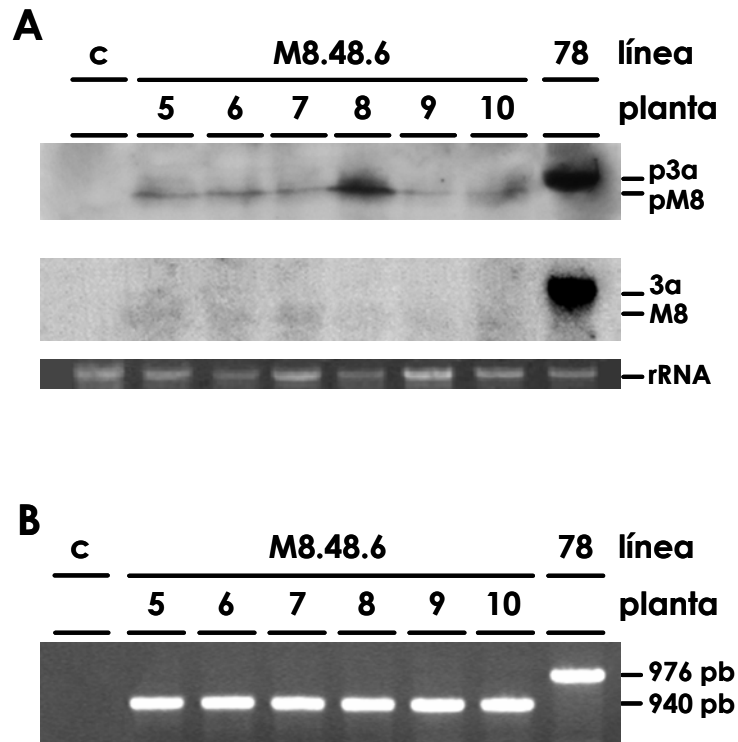


Fig. 3.26 A. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM8 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en plantas pertenecientes a la línea M8.48.6. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados. En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

B. Análisis, mediante RT-PCR, de los RNAs derivados de los transgenes de las plantas M8.48.6 y 78. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados. El tamaño de las bandas obtenidas se indica a la derecha de la figura.

Con objeto de estudiar la funcionalidad de la proteína pM8, inoculamos con el mutante CMV-Fny Δ Kpn las seis plantas M8.48.6 así como los controles (78 y GUS) y determinamos la acumulación viral tanto en las hi como en las hs a los tiempos p.i. citados anteriormente, mediante ensayos de Northern blot. En este ensayo (Fig. 3.27 A y B, y datos no mostrados), detectamos los RNAs virales en las hi de todas las plantas analizadas, si bien en las plantas GUS disminuían progresivamente entre los 3 y los 7 d.p.i. mientras que, en las plantas M8 aumentaban en este periodo. También fue posible hallarlos en las hs de cuatro plantas M8: en las plantas nº 7 y 9 a partir de los 7 d.p.i., y en las plantas nº 8 y 10 a los 14 d.p.i.. En las plantas 78, el RNA viral se encontró en los dos tipos de hojas y en todos los tiempos ensayados, en cantidades crecientes y

superiores a los determinados en las plantas M8.48.6. En todos los casos la movilidad electroforética del RNA acumulado en estas plantas era menor que la del RNA 3 de CMV-24, indicando que se trataba del RNA 3 delecionado de CMV-Fny Δ Kpn.

No obstante, y para corroborar los datos sobre la acumulación viral en las hojas sistémicas obtenidos mediante los ensayos de Northern blot, y así comprobar la identidad del RNA 3 detectado, amplificamos dichos RNAs mediante ensayos de RT-PCR, utilizando los cebadores 129 y 135 (aptdos. 2.1.5, 2.2.13 y 2.2.14 de M. y M.). Como controles del ensayo, utilizamos los RNAs encapsidados virales de CMV-24 y CMV-Fny Δ Kpn. La amplificación de los mismos originó dos bandas de DNA de 988 y 466 pb, respectivamente (Fig. 3.27 C). Asimismo, visualizamos bandas de 466 pb tras la amplificación de los RNAs extraídos de las hs de las plantas nº 8 y 10 a los 14 d.p.i, y de las plantas nº 7, 9 y 78 a los 7 y 14 d.p.i. En el resto de las muestras no obtuvimos ninguna banda de amplificación.

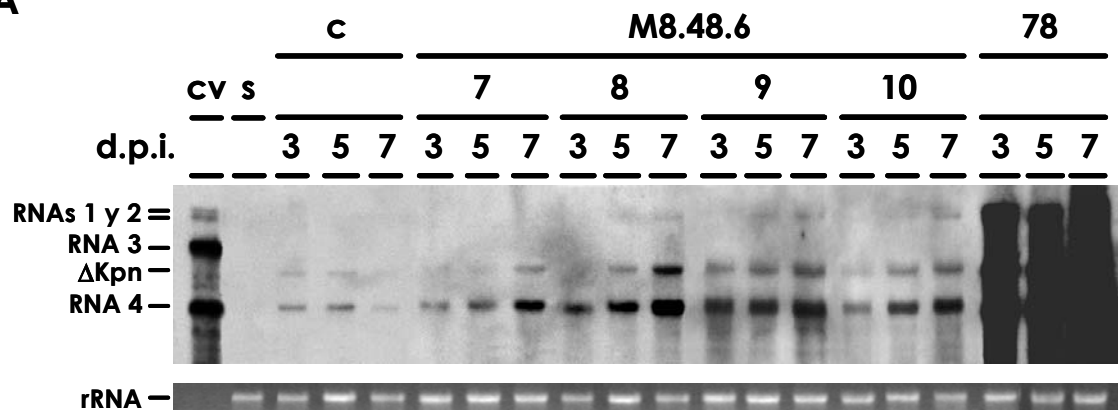
La secuenciación de dos de estas bandas (plantas nº 9 y 78) mostró que en ambos casos correspondían a las secuencias del RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn, y por tanto, se descartaba la posibilidad de que la presencia del virus en las hs de las plantas M8 y 78 fuera debida a que el mutante defectivo hubiese sufrido algún suceso de recombinación o mutación que restaurase la función de movimiento.

Fig. 3.27. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación de los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hi (**A**) y en las hs (**B**) de las plantas control GUS (c), plantas M8.48.6 y plantas 3a (78), a los tiempos indicados en la figura. Δ Kpn: RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn; cv: RNA de CMV-24 control; s: RNA total de planta control sana. Los nº 7, 8, 9 y 10 indican los distintos individuos M8.48.6 ensayados. Las posiciones de los RNAs 1, 2 y 3 se indican a la izquierda de la figura. Debajo de cada gel se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

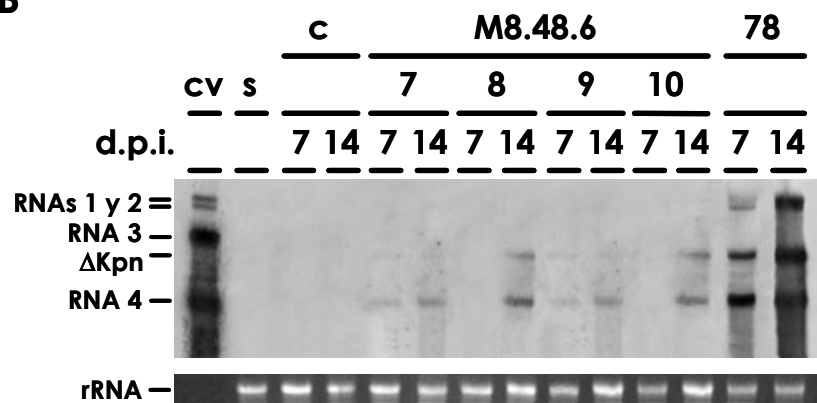
C. Análisis, mediante RT-PCR, del RNA 3 en las hs de las plantas control GUS (c), plantas M8.48.6 y plantas 3ª (78), a los tiempos indicados en la figura. CMV-24: RNA de CMV-24 control; CMV-Fny Δ Kpn: RNA control de CMV-Fny Δ Kpn. Los nº 5, 6, 7, 8, 9 y 10 indican los distintos individuos M8.48.6 analizados.

El tamaño de las bandas de amplificación se muestra a la izquierda de la figura.

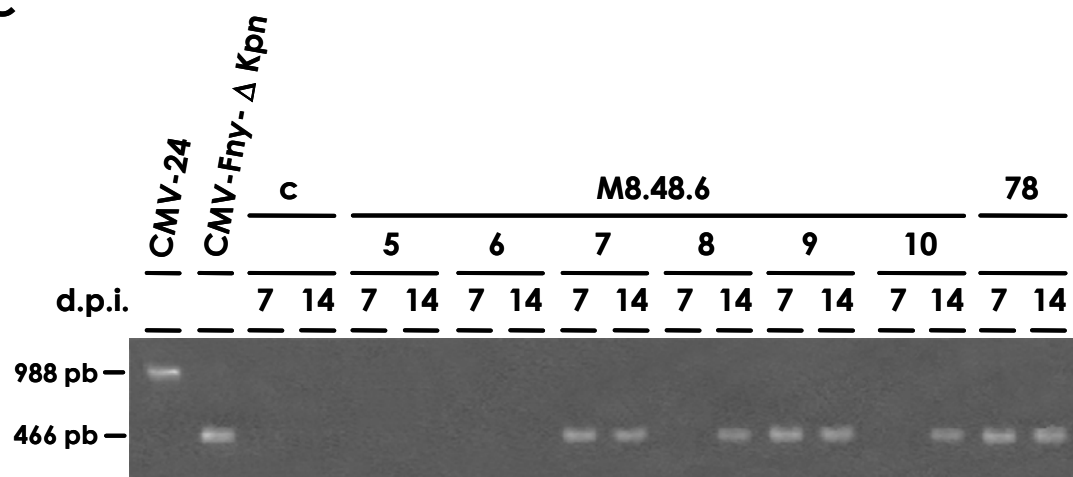
A



B



C



Los datos obtenidos ponen de manifiesto que la proteína pM8 es capaz de complementar *in trans* las funciones de movimiento viral, pero en menor grado que la proteína 3a, puesto que los niveles de acumulación viral son inferiores, y en algunas plantas M8.48.6 el movimiento a larga distancia o bien está retrasado con respecto a las plantas control (plantas nº 8 y 10) o bien no se produce (plantas nº 5 y 6).

3.5.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M8 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24

Para determinar si la expresión constitutiva de la proteína pM8 en plantas de tabaco afectaba a la infección del virus homólogo CMV-24, hemos seguido su infección en plantas de tabaco de diecisiete líneas M8 de la generación F0: 2, 6, 11, 14, 16, 19, 21, 22, 24, 36, 39, 40, 42, 48, 55, 59 y 60, que la expresan constitutivamente.

3.5.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En las plantas control, los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, típicos de la infección mediada por CMV-24, aparecieron en la 2-3ª h.p.i. y, a partir del 5-7º d.p.i.

Este mismo comportamiento se observó en todas las plantas de doce líneas M8 (2, 6, 11, 19, 36, 39, 40, 42, 48, 55, 59 y 60) y en algunas de cuatro líneas (14, 21, 22 y 24). Sin embargo, no desarrollaron síntomas a este tiempo el 37,5% de las plantas M8.14 y el 12,5% de las plantas M8.21, M8.22 y M8.24. El 75% de las plantas M8.16 no mostró síntomas y, en el 25% restante si bien se observaron a partir de la 2-3ª h.p.i., fueron de menor intensidad que en los controles.

A los 14 d.p.i., se acentuaron los síntomas de moteado y aclaramiento de venas en las plantas control y aparecían a partir de la 4ª h.p.i. Esta misma evolución se encontró en las plantas de todas las líneas analizadas, a excepción de las plantas M8.16, donde o bien no observamos síntomas (37,5%) o bien los desarrollaron con menor fuerza que los controles (62,5%).

3.5.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral determinada en las hi de las plantas control fue de $20,66 \pm 3,60$ y $16,83 \pm 5,95$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.28).

Hojas inoculadas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	20,66 ± 3,60	100	16,83 ± 5,95
2	100	9,54 ± 0,87	100	7,92 ± 0,74
6	75	5,93 ± 1,07	100	24,72 ± 2,56
11	100	11,76 ± 3,88	100	41,78 ± 4,46
14	100	13,04 ± 3,81	100	28,11 ± 1,64
16	87.5	7,72 ± 1,13	100	12,31 ± 1,13
19	100	9,85 ± 2,04	100	16,82 ± 2,41
21	87.5	14,47 ± 1,83	100	30,05 ± 6,22
22	100	10,04 ± 0,91	100	5,65 ± 0,64
24	100	29,70 ± 2,72	100	17,87 ± 3,40
36	100	10,30 ± 0,98	100	7,70 ± 1,01
39	83,34	17,09 ± 3,99	100	12,63 ± 1,45
40	62.5	8,27 ± 0,73	100	6,43 ± 0,47
42	100	31,05 ± 2,98	100	27,71 ± 4,67
48	100	165,64 ± 14,27	100	6,94 ± 0,77
55	100	26,13 ± 3,28	100	11,38 ± 1,78
59	100	9,35 ± 0,49	100	10,68 ± 4,21
60	100	11,95 ± 1,17	100	10,68 ± 1,40

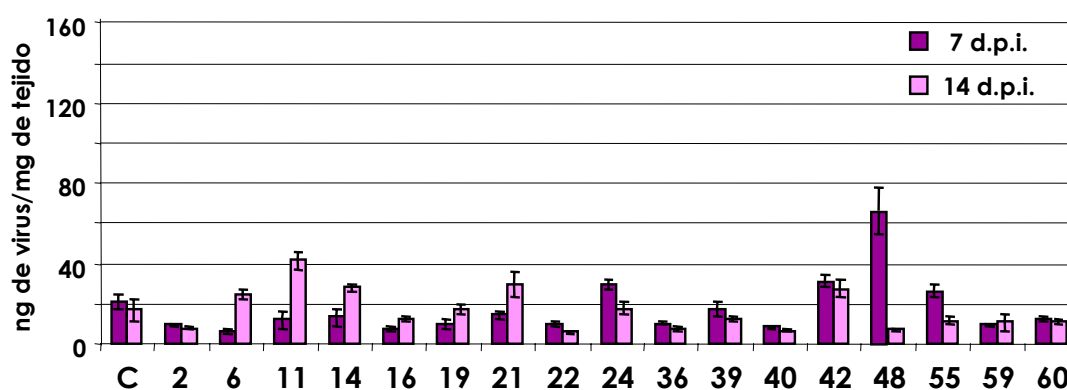


Fig. 3.28. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M8 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

En las hi de las plantas de dos de las diecisiete líneas M8 ensayadas (39 y 55), la carga viral a los 7 d.p.i. fue semejante a la control; aunque a este tiempo, no se detectó el virus en el 16,66% de las plantas M8.39. A los 14 d.p.i., en todas ellas la concentración viral fue similar a la control (Fig. 3.28).

En algunas o todas las plantas de doce líneas M8 (2, 6, 11, 14, 16, 19, 21, 22, 36, 40, 59 y 60) la concentración viral en la hi fue inferior a la control, acentuándose la diferencia en las plantas M8.6 ($5,93 \pm 1,07$ ng de virus/mg de tejido). No encontramos el virus en el 12,5% de las plantas M8.16 y M8.21, en el 25% de las plantas M8.6, ni en el 37,5% de las plantas M8.40. A los 14 d.p.i., en las plantas de cuatro de estas líneas (2, 22, 36 y 40) la acumulación viral se mantuvo inferior, siendo más acusada esta diferencia en las plantas M8.22 ($5,65 \pm 0,64$ ng de virus/mg de tejido). Sin embargo, en las plantas de las otras siete líneas M8 (6, 11, 14, 16, 19, 21, 59 y 60) se calculó un incremento en las tasas de acumulación viral, alcanzando un máximo en las plantas M8.11 ($41,78 \pm 4,46$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.28).

Las plantas de las tres líneas M8 restantes (24, 42 y 48) mostraron unas tasas de acumulación virales en las hi superiores a la control a los 7 d.p.i., alcanzando un valor máximo en las plantas M8.48 ($57,36 \pm 6,29$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., también fue superior en las plantas M8.42 ($27,71 \pm 4,67$ ng de virus/mg de tejido), mientras que en las plantas M8.24 y M8.48 fue similar o inferior a la control.

3.5.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control, la concentración viral fue de $19,95 \pm 83,07$ y $8,19 \pm 0,69$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.29).

En las hs de las plantas de seis de las diecisiete líneas M8 ensayadas (14, 19, 22, 36, 40 y 59), la carga viral a los 7 d.p.i. fue semejante a control (Fig. 3.29). Este comportamiento se mantuvo a los 14 d.p.i. en las plantas M8.14 mientras que en las plantas de cuatro de estas seis líneas M8 (22, 36, 40 y 59) la concentración viral fue inferior a la control, acentuándose algo más esta diferencia en las plantas M8.59 ($4,32 \pm 0,23$ ng de virus/mg de tejido). Por el contrario, en plantas M8.19 la carga viral se incrementó ($33,97 \pm 11,03$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.29).

Hojas sistémicas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	19,95 ± 3,07	100	8,19 ± 0,69
2	100	47,69 ± 3,43	100	4,94 ± 0,48
6	100	10,10 ± 2,15	100	7,34 ± 0,78
11	100	8,45 ± 1,34	100	6,94 ± 0,68
14	100	15,53 ± 2,33	100	8,69 ± 0,91
16	50	9,83 ± 2,48	62,5	24,21 ± 3,93
19	100	24,61 ± 1,10	100	33,97 ± 11,03
21	100	10,87 ± 2,23	100	8,79 ± 0,91
22	100	24,07 ± 1,19	100	5,40 ± 0,65
24	100	59,21 ± 6,78	100	3,80 ± 0,20
36	100	17,72 ± 2,29	100	5,05 ± 0,36
39	100	11,73 ± 1,43	100	18,24 ± 6,01
40	100	25,31 ± 7,27	100	5,22 ± 0,62
42	100	123,04 ± 13,72	100	6,39 ± 0,95
48	100	42,72 ± 3,58	100	2,66 ± 0,12
55	100	67,27 ± 5,29	100	3,83 ± 0,39
59	100	18,23 ± 1,84	100	4,32 ± 0,23
60	100	31,35 ± 1,41	100	4,98 ± 0,46

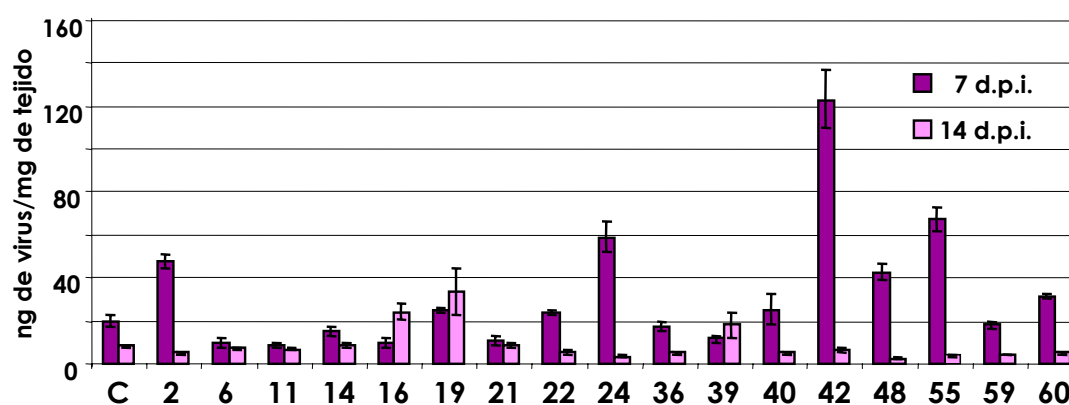


Fig. 3.29. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas sistémicas de plantas M8 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

En las hs de las plantas de cinco líneas M8 (6, 11, 16, 21 y 39) detectamos a los 7 d.p.i. cargas virales inferiores a la de las plantas control, siendo algo mayor la diferencia en las plantas M8.11 ($8,45 \pm 1,34$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., y respecto a las plantas control, la concentración viral fue similar en plantas de tres líneas (6, 11 y 21) y superior a en las plantas de dos de ellas (16 y 39), siendo más acusada la diferencia en el 62,5% de las plantas M8.16 ($24,21 \pm 3,93$ ng de virus/ mg de tejido). Por otro lado, en el 50 y 37,5% de estas últimas no detectamos el virus a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

Por último, en las hs de las plantas correspondientes a seis líneas M8 (2, 24, 42, 48, 55 y 60), el contenido viral a los 7 d.p.i. fue superior al de las plantas control, aunque a los 14 d.p.i., en todas ellas fue inferior.

Estos análisis revelaban un comportamiento heterogéneo de las plantas M8 frente a la infección viral. Así, en las plantas de seis líneas (2, 24, 42, 48, 55 y 60), la expresión constitutiva de la proteína M8 parecía favorecer la invasión sistémica viral, como muestran los mayores niveles de acumulación de virus en las hs de estas plantas a los 7 d.p.i. No obstante, a los 14 d.p.i. la carga viral sufre una caída en estas hojas y alcanza un valor inferior a la control. Este hecho ocurre independientemente de la concentración viral determinada a los 7 d.p.i. en las hi puesto que en dos líneas M8 (2 y 60) dicha acumulación viral es inferior, en 1 línea (48) es superior y en 3 líneas (24, 42 y 55) no muestra diferencias significativas. Por otro lado, todas estas plantas desarrollan una sintomatología a lo largo de la infección viral similar a la presente en las plantas control.

En las plantas de cinco líneas M8 (19, 22, 36, 40 y 59), se encontraba una inhibición en el establecimiento de la infección local, reflejándose en menores tasas de acumulación que en los controles en las hi a los 7 d.p.i. y que se mantenía en 3 de ellas (22, 36 y 40) a los 14 d.p.i. Este retraso no afectaba a la invasión sistémica ya que, en estas plantas, la carga viral encontrada en las hs a los 7 d.p.i no muestra diferencias significativas respecto a la control. Los síntomas desarrollados por estas plantas a lo largo de la infección viral también fueron semejantes a los de las plantas control.

En contraposición a las anteriores, en plantas de seis líneas M8 (6, 11, 14, 16, 21 y 39), hallábamos una inhibición en el establecimiento de la infección local y sistémica puesto que los niveles de concentración viral encontrados en ambos tipos de hojas a los 7 d.p.i. eran inferiores a los determinados para las plantas control. Sin embargo, a los 14 d.p.i., la carga viral alcanzaba valores semejantes y en algún caso superior.

Además, en el 37,5% de las plantas M8.16 no detectamos el virus en las hs a ninguno de los dos tiempos analizados. Por otro lado, como se describe anteriormente, algunas de estas plantas no desarrollaron síntomas, aunque en la mayoría eran similares a los controles.

3.5.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M8 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Seleccionamos cinco de estas plantas F0 para obtener, por autofecundación, la generación F1:

-La planta M8.6.8, donde la carga viral determinada en las hi a los 7 d.p.i. fue inferior (10,87 ng de virus/mg de tejido) y a los 14 d.p.i. semejante (19,64 ng de virus/mg de tejido) a la control. En las hs, la concentración viral a los 7 d.p.i. fue similar (23,61 ng de virus/mg de tejido) y a los 14 d.p.i. inferior (4,50 ng de virus/mg de tejido) a la de las plantas GUS.

-La planta M8.16.5, cuya carga viral calculada en las hi a los 7 (4,26 ng de virus/mg de tejido) y 14 d.p.i. (12,18 ng de virus/mg de tejido) fue inferior a la control. En esta planta no detectamos el virus en las hs.

-La planta M8.39.1, donde los niveles de acumulación viral en las hi a los 7 y 14 d.p.i. fueron semejantes a los de las plantas control: 16,85 y 11,56 ng de virus/mg de tejido, respectivamente. En las hs, la carga viral, en los dos tiempos ensayados, fue inferior a la control: 15,42 y 2,99 ng de virus/mg de tejido, respectivamente.

-La planta M8.40.3, en la que no detectamos el virus en las hi a los 7 d.p.i. y, a los 14 d.p.i., la concentración viral fue inferior (7,85 ng de virus/mg de tejido). En las hs, la acumulación viral a los 7 d.p.i. fue superior (43,42 ng de virus/mg de tejido) y, a los 14 d.p.i., inferior (3,15 ng de virus/mg de tejido) a la determinada en los controles.

-La planta M8.48.6, cuya acumulación viral en las hi a los 7 d.p.i. fue superior a la control (54,25 ng de virus/mg de tejido) mientras que, a los 14 d.p.i., fue inferior (7,66 ng de virus/mg de tejido). En las hs encontramos, respecto al control, un patrón de infección similar; así a los 7 d.p.i. la carga viral fue superior (38,54 ng de virus/mg de tejido) y a los 14 d.p.i. inferior (3,00 ng de virus/mg de tejido).

Todas estas plantas, a excepción de la planta M8.16 en las que no se observaron síntomas, desarrollaron una sintomatología similar a la desarrollada por las plantas control.

Tras la inoculación de CMV-24 en la progenie de estos individuos seleccionados, así como de las correspondientes plantas GUS, llevamos a cabo el seguimiento de la infección viral mediante la observación de los síntomas y la cuantificación de la carga viral en las hi y hs.

3.5.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En el 50% de los controles, los síntomas típicos de la infección mediada por CMV-24, aparecieron en la 2ª h.p.i., y a partir del 5º-7º d.p.i.. El resto no desarrolló síntomas.

Tampoco los visualizamos en el 25% de las plantas M8.6.8 y en el 57,14% de las plantas M8.16.5 y M8.39.1. En las plantas restantes, así como en todas las plantas M8.40.3 y M8.48.6 observamos los síntomas de moteado y aclaramiento de venas a partir de la 2ª h.p.i. y de intensidad similar a los controles.

A los 14 d.p.i., el 100% de las plantas control mostraron síntomas más intensos a partir de la 3ª-4ª h.p.i.

En las plantas de todas las líneas M8, a excepción del 42,86% y el 25% de las plantas M8.39.1 y M8.40.3 donde no observamos síntomas, eran visibles a partir de la 3ª-4ª h.p.i. y de intensidad similar a los control en todas ellas, excepto en las plantas M8.40.3, donde eran de menor intensidad.

3.5.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral establecida en las hi de las plantas control fue de $100,70 \pm 10,46$ y $95,14 \pm 12,01$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.30).

Fig. 3.30. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de las plantas M8 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

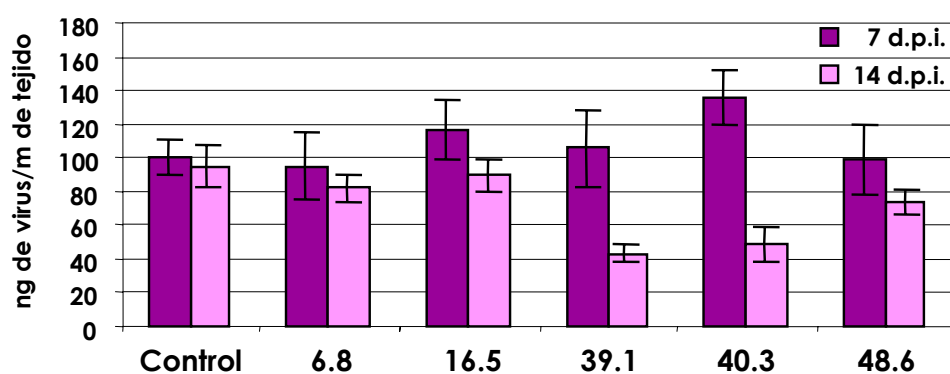
Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Hojas inoculadas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	100,70 ± 10,46	100	95,14 ± 12,01
6.8	100	94,57 ± 19,97	100	82,00 ± 7,88
16.5	100	116,29 ± 18,17	100	89,73 ± 9,37
39.1	100	105,64 ± 22,66	100	43,46 ± 4,82
40.3	100	135,21 ± 16,18	100	48,66 ± 9,82
48.6	100	98,90 ± 20,28	100	73,58 ± 7,50

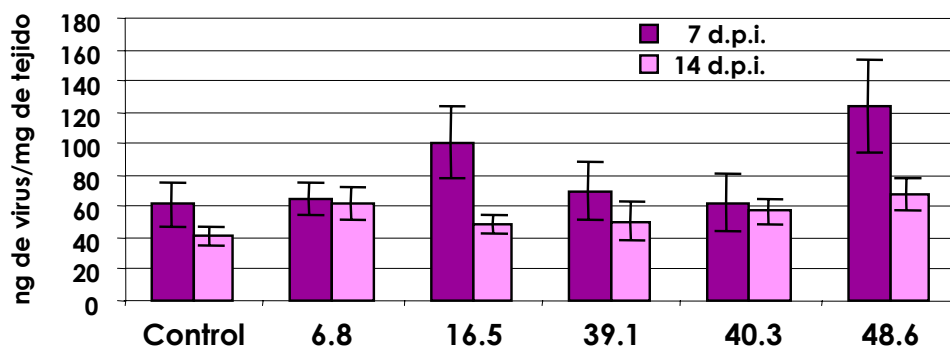


Hojas sistémicas

7 d.p.i.

14 d.p.i.

Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	61,37 ± 14,12	100	41,36 ± 6,37
6.8	100	64,94 ± 10,72	100	62,18 ± 10,75
16.5	100	101,05 ± 22,70	100	48,08 ± 5,92
39.1	100	69,74 ± 18,29	100	50,62 ± 12,48
40.3	100	62,66 ± 18,40	100	56,88 ± 7,81
48.6	100	124,19 ± 29,30	100	67,65 ± 10,49



En plantas de cuatro líneas M8 (6.8, 16.5, 39.1 y 48.6), y respecto a las hi de las plantas control, la carga viral a los 7 d.p.i. fue similar. A los 14 d.p.i., también fue semejante en las plantas de dos líneas (6.8 y 16.5), mientras que en las plantas M8.39.1 y M8.48.6 fue inferior, siendo más significativa esta diferencia en las primeras ($43,46 \pm 4,82$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.30).

En las hi de las plantas M8.40.3 calculamos tasas de acumulación viral superiores a las control ($135,21 \pm 16,18$ ng de virus/mg de tejido), pero inferiores ($48,66 \pm 9,82$ ng de virus/mg de tejido) a los 14 d.p.i., (Fig. 3.30).

3.5.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control, los niveles de acumulación viral calculados fueron de $61,37 \pm 14,12$ y $41,36 \pm 6,37$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.30).

Al igual que ocurría en las hi, no apreciamos diferencias significativas en las hs de las plantas M8.6.8 y M8.39.1, exceptuando una concentración viral ligeramente superior en las hs de las plantas M8.6.8 a los 14 d.p.i. (Fig. 3.30). En las hs de la línea M8.40.3 también encontramos tasas de acumulación virales semejantes a las control, a pesar de que en las hi a los 7 d.p.i se habían determinado contenidos superiores (Fig. 3.30).

A diferencia de estas tres líneas, la carga viral hallada en las hs de las plantas M8.16.5 y M8.48.6 fue superior a la control, acentuándose en las últimas ($124,19 \pm 29,30$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., mantuvieron este comportamiento las plantas M8.48.6 ($67,65 \pm 10,49$ ng de virus/mg de tejido) mientras que, en las plantas M8.16.5 la carga viral fue semejante a la control (Fig. 3.30).

A rasgos generales, los datos muestran que dos de las cinco líneas M8 ensayadas (6.8 y 39.1) reaccionan frente a la infección viral de manera similar a las plantas control. No obstante, en las plantas de las tres líneas restantes, la acumulación de CMV-24 aumenta de forma significativa con respecto al control, bien en las hi (línea 40.3), bien en las hs (líneas 16.5 y 48.6). Así por ejemplo, los valores de carga viral calculados en las hs de la planta M8.48.6 son 2 y 1,64 veces superiores a los de las plantas control a los 7 y 14 d.p.i.. Aunque no podemos descartar por el momento que los datos reflejen una mayor replicación viral, el hecho de que las mayores diferencias en las tasas de acumulación entre algunas plantas M8 y las plantas GUS se acusen a los 7 d.p.i., podría ser indicativo de que en estas plantas se vea favorecido el

movimiento viral y como consecuencia de ello, el nº de células infectadas aumentaría y consiguientemente la concentración viral sería superior.

Finalmente, de los datos limitados que poseemos sobre el contenido en proteína pM8, y el efecto sobre la acumulación viral, no podemos establecer si las diferencias encontradas entre las distintas líneas pueden ser adscritas a diferencias en el contenido de dicha proteína.

3.5.4.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M8

Para determinar si las mayores tasas de acumulación viral encontradas hs de las plantas M8.48.6 van asociadas al establecimiento de un mayor nº de focos de infección y analizar el patrón de invasión viral en estos individuos, llevamos a cabo la detección del virus a los 3 y 5 d.p.i. en improntas de tejido (aptdo. 2.2.18 de M. y M.)

Para ello, inoculamos la primera hoja desarrollada de cuatro plantas GUS y cuatro plantas M8.48.6 con CMV-24 y analizamos dos plantas de cada línea en cada uno de los tiempos. El RNA viral fue detectado con la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24.

A los 3 d.p.i., en las plantas M8 y GUS hallamos los RNAs virales sólo en las hi, aunque el nº, intensidad y expansión de los focos de infección en las plantas M8.48.6 fueron significativamente superiores a los encontrados en las plantas control (Fig. 3.31).

A los 5 d.p.i., detectamos el virus en las hi, hs, tallo y ápice de las dos plantas M8 ensayadas, y a partir de la 2ª h.p.e.i. En las plantas GUS el patrón de infección viral fue semejante al de las plantas M8. Sin embargo, en las hi de las plantas M8, el nº, intensidad y expansión de los focos de infección fue superior al encontrado en las plantas control (Fig. 3.31).

Estos resultados indican que la expresión constitutiva en plantas de la proteína pM8, que es una proteína funcional, facilita la infección viral.

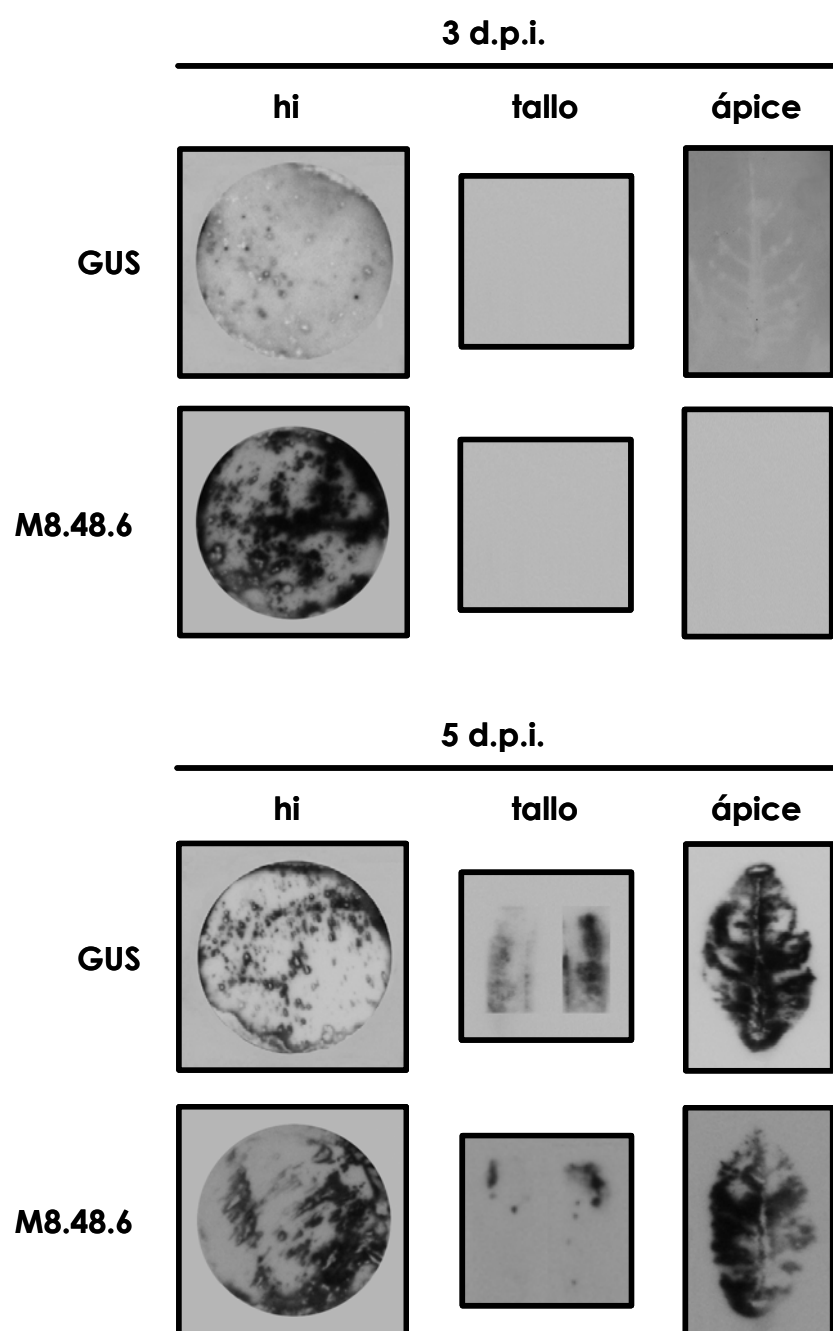


Fig. 3.31. Análisis de la distribución de los RNAs de CMV-24 en las hi, tallos y ápices de las plantas control GUS y de las plantas M8.48.6 en los tiempos indicados en la figura. hi: hoja inoculada.

3.6.- Caracterización de las plantas M9

3.6.1- Análisis de la funcionalidad de la proteína pM9

Para determinar si la proteína pM9 conserva la función de movimiento de la proteína p3a, hemos analizado su capacidad de complementar *in trans* el movimiento del virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn. Con este propósito, seleccionamos cuatro líneas de plantas independientes pertenecientes a la generación F1: 9.1, 36.7 53.1 y 68.10. Inicialmente, procedimos al análisis de los niveles de acumulación del mRNA del transgén y de su correspondiente proteína pM9 en cuatro plantas de cada una de las líneas citadas anteriormente. Como plantas control empleamos plantas 78 y plantas GUS. Mediante ensayos de Northern blot (Fig. 3.32), detectamos el RNA M9 en las dieciséis plantas ensayadas, y éste mostraba una movilidad electroforética mayor que el de las plantas 3a (Fig. 3.32). Por otro lado, en los ensayos de inmunodetección, utilizando el suero frente a la proteína p3a, encontramos la proteína pM9 en todas las plantas M9. La movilidad electroforética de esta proteína fue mayor que la de la proteína p3a, indicativa de su menor masa aparente, que corresponde a una delección de 9 aa, abarcando desde los aa 204 a 212.

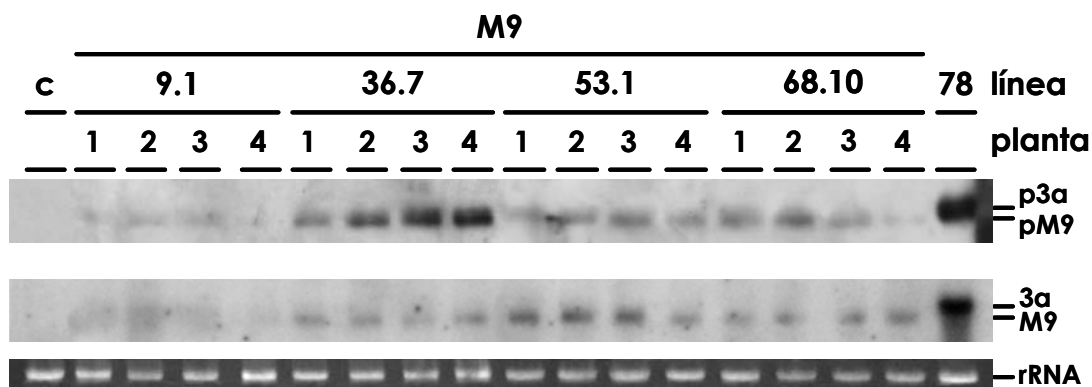


Fig. 3.32. Análisis, mediante ensayos de Western y Northern blot, de la acumulación de la proteína pM9 (panel superior) y de su correspondiente mRNA (panel intermedio) en las plantas M9.9.1, M9.36.7, M9.53.1 y M9.68.10. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

Encontramos niveles de acumulación heterogéneos, tanto del RNA M9 como de la proteína pM9, entre las plantas de una misma línea y entre las plantas de líneas distintas y, no pudimos establecer una correlación entre ambos. Los mayores niveles de

acumulación del RNA M9 se detectaron en las plantas M9.53.1 y los de proteína pM9 en las plantas M9.36.7. No obstante, en las plantas M9.9.1 se encontraron los menores niveles de acumulación de ambos productos.

Seleccionamos tres plantas, en base a la acumulación de la proteína pM9, para llevar a cabo los ensayos de complementación con el virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn: M9.9.1.1, M9.36.7.3 y M9.53.1.2 -cuyos contenidos en proteína pM9 eran bajos, altos e intermedios, respectivamente-. Como controles positivos y negativos de la complementación, también inoculamos con este virus dos plantas 3a y dos plantas GUS, respectivamente. Posteriormente, procedimos al análisis de la cinética de acumulación de los RNAs virales en las hi a los 3, 5 y 7 d.p.i. y en las hs (2ª y 3ª h.p.e.i.) a los 7 y 14 d.p.i., mediante ensayos de Northern blot a partir de los extractos de RNA totales. Usamos una ribosonda específica para la región 3'-NC del RNA 3 de CMV, que no detecta los transgenes virales de las plantas. Debido a las diferencias de carga de RNA entre las distintas muestras, las señales de hibridación de cada una de ellas fueron cuantificadas densiométricamente y se normalizaron sobre los valores de absorbancias del rRNA 18S de las mismas.

En las plantas GUS, no encontramos los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en ningún tipo de hoja y en ninguno de los tiempos ensayados (Fig. 3.33).

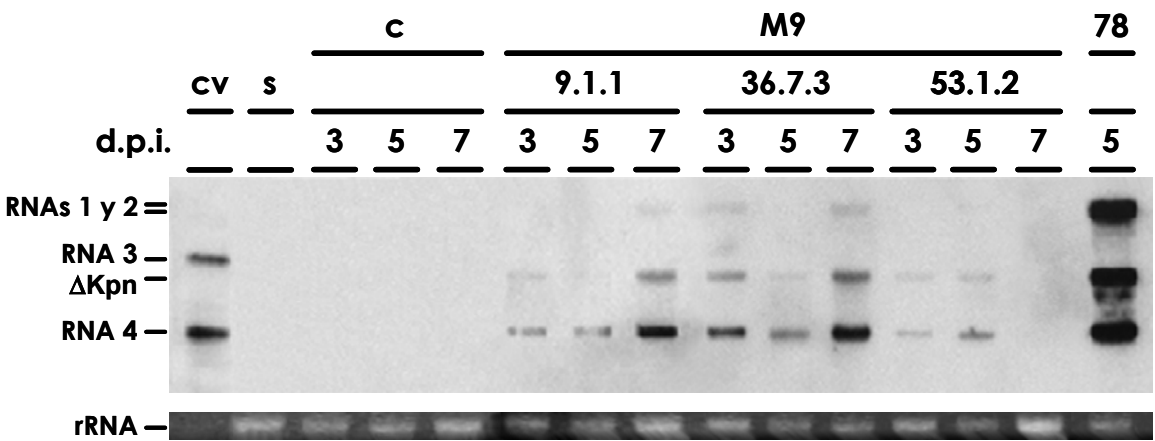


Fig. 3.33. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación de los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hojas inoculadas de las plantas control GUS (c), plantas M9.9.1.1, M9.36.7.3 y M9.53.1.2, y plantas 3a (78) a los tiempos indicados en la figura. . Δ Kpn: RNA 3 de CMV-Fny Δ Kpn; cv: RNA de CMV-24 control; s: RNA total de planta control sana. Las posiciones de los RNAs 1, 2 y 3 se indican a la izquierda de la figura
En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

En las plantas M9 encontramos dos tipos de comportamientos. Así, en las plantas M9.9.1.1 y M9.36.7.3, la cinética de acumulación de los RNAs virales en las hi fue ascendente, alcanzando el máximo a los 7 d.p.i.. Además, en la primera, la acumulación de los mismos fue mayor. Por otro lado, en las plantas M9.53.1.2 dicha cinética fue descendente, se alcanzaba un máximo a los 5 d.p.i. y, se producía una caída a los 7 d.p.i. (Fig. 3.33).

En ninguna de estas plantas detectamos los RNAs de CMV-Fny Δ Kpn en las hojas sistémicas (datos no mostrados). En las plantas 78, encontramos los RNAs virales tanto en las hi como en las hs en todos los tiempos ensayados. En las plantas 78, los RNAs mostraban una cinética de acumulación ascendente y muy superior a presente en las plantas M9.

Los resultados indican que la proteína pM9, expresada por las líneas M9.9.1 y M9.36.7, independientemente de su nivel de acumulación y/o de los niveles de expresión del transgén M9, complementa el movimiento a corta distancia viral. En ninguno de los casos esta proteína es capaz de establecer la infección sistémica. Por tanto, la delección de la región comprendida entre los aa 204 a 212 no afecta a la funcionalidad de la proteína, si bien su actividad es reducida en comparación a la proteína p3a, dado que el contenido de RNA viral en las hi de estas plantas es muy superior al de las plantas M9.

3.6.2.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína M9 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24

Hemos llevado a cabo el seguimiento de la infección por CMV-24 en plantas de dieciséis líneas de la generación F0 que expresan constitutivamente la proteína pM9: 9, 12, 14, 14', 15, 16, 21, 23, 28, 34, 36, 37, 45, 53, 65 y 68. Como control utilizamos plantas GUS.

3.6.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

Tras la inoculación con CMV-24, en las plantas control los síntomas de moteado y aclaramiento de venas aparecieron en la 2ª-3ª h.p.e.i. a partir del 5-7º d.p.i.

Un patrón de síntomas similar se observó en las plantas de doce de las dieciséis líneas M9 ensayadas (9, 14, 14', 15, 16, 23, 28, 34, 36, 37, 45 y 68). En algunas plantas de otras tres líneas (12, 21 y 53), no desarrollaron síntomas (el 12,5% de las plantas M9.21, el

25% de M9.12, y el 50% M9.53). Las demás plantas de estas líneas mostraron síntomas similares a los de las plantas control.

En la línea M9.65, el 50% de las plantas no desarrollaron síntomas y en el resto, éstos eran de menor intensidad que los de las plantas control, y se visualizaban a partir de la 3ª h.p.i.

A los 14 d.p.i., se acentuaron los síntomas de moteado y aclaramiento de venas en las plantas control, observándose a partir de la 4ª h.p.e.i.

Esta misma evolución se observó en las plantas de nueve líneas M9 cuyos síntomas eran indistinguibles de los de las plantas control a los 7 d.p.i. (9, 14, 15, 23, 28, 34, 36, 37 y 45), así como en las plantas M9.12, aunque algunas de estas últimas no mostraron síntomas.

Por otro lado, observamos síntomas de menor intensidad que los controles y a partir de la 5ª h.p.e.i. en las plantas de cinco líneas M9 (14', 16, 21, 65 y 68); tres de ellas (14', 16, y 68) tenían síntomas más débiles que los controles a los 7 d.p.i., y en dos (21, 65) algunas de las plantas carecían de síntomas a este tiempo.

Al igual que ocurría a los 7 d.p.i., en el 50% de las plantas M9.53, no visualizamos síntomas y, en las demás, si bien los desarrollaron, eran muy atenuados.

3.6.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La carga viral determinada en las hi de las plantas control, fue de $27,12 \pm 7,80$ y $30,44 \pm 8,35$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.34).

Para las plantas de doce líneas M9 (9, 12, 14, 14', 16, 21, 23, 28, 34, 45, 65 y 68), los niveles de acumulación viral a los 7 d.p.i., fueron similares a los controles (Fig. 3.34). Este comportamiento se mantuvo a los 14 d.p.i. en las plantas de ocho de estas doce líneas (9, 12, 14, 14', 23, 28, 45 y 65) mientras que, en las plantas de las otras cuatro líneas (16, 21, 34 y 68) la carga viral fue inferior a la control, acentuándose esta diferencia en las plantas M9.68 ($9,27 \pm 0,78$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.34).

En plantas de tres líneas M9 (15, 36 y 53) la concentración viral a los 7 d.p.i., fue significativamente inferior a la control, alcanzando un valor mínimo en las plantas M9.53 ($10,06 \pm 2,02$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., la carga viral en las plantas M9.15 y M9.36 fue semejante y, en las plantas M9.53 inferior ($10,35 \pm 1,05$ ng de virus/mg de tejido) a la control (Fig. 3.34).

Finalmente, en las plantas M9.37, la carga viral determinada a los 7 d.p.i. fue superior a la control, alcanzando una concentración de $45,28 \pm 7,08$ ng de virus/mg de

tejido. A los 14 d.p.i., la carga viral en estas hojas fue similar a la establecida para las plantas control (Fig. 3.34).

Hojas inoculadas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	27,12 ± 7,80	100	30,44 ± 8,35
9	100	18,92 ± 2,65	100	29,68 ± 4,21
12	100	35,31 ± 3,18	100	32,59 ± 4,82
14	100	31,34 ± 3,34	100	31,20 ± 4,66
14'	100	37,77 ± 4,40	100	23,95 ± 2,57
15	100	12,72 ± 0,84	100	22,89 ± 2,90
16	100	32,04 ± 3,76	100	16,97 ± 1,46
21	100	20,68 ± 2,60	100	19,18 ± 2,06
23	100	20,27 ± 1,69	100	34,80 ± 4,98
28	100	38,77 ± 3,59	100	20,65 ± 3,30
34	100	25,00 ± 3,00	100	18,79 ± 2,07
36	100	12,63 ± 1,18	100	46,77 ± 7,98
37	100	45,28 ± 7,08	100	24,01 ± 2,54
45	100	26,93 ± 1,42	100	22,89 ± 2,69
53	100	10,06 ± 2,02	100	10,35 ± 1,05
65	100	20,31 ± 3,36	100	21,07 ± 2,94
68	100	19,53 ± 5,95	100	9,27 ± 0,76

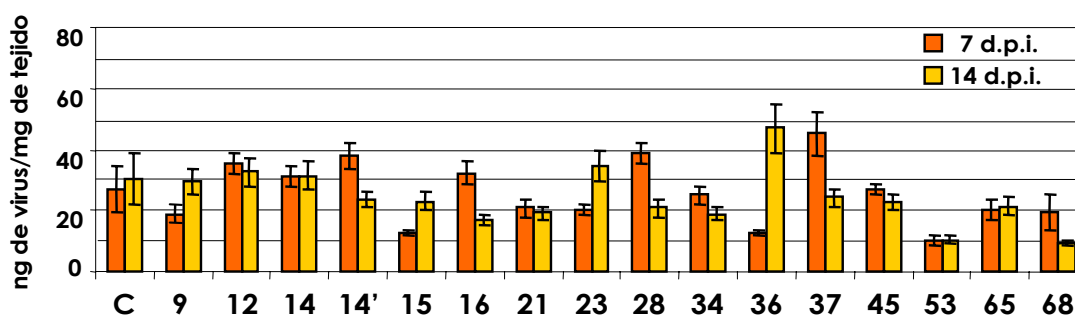


Fig. 3.34. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M9 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.6.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control, la acumulación viral calculada fue de $39,13 \pm 6,70$ y $30,11 \pm 4,22$ ng de virus/mg de tejido a los 7 d.p.i. y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.35).

Al igual que en las hi a los 7 d.p.i., determinamos cargas virales semejantes a la control en las plantas de siete de las líneas M9 (9, 12, 23, 28, 45, 65 y 68) como ocurría en la hi, así como en las plantas M9.36, cuyo contenido en la hi a este tiempo era menor (Fig. 3.34 y 3.35), aunque en el 12,5% de las plantas M9.65 y M9.68 no se detectó el virus. A los 14 d.p.i., se mantuvo este comportamiento en las plantas de tres de estas líneas M9 (12, 23 y 45). En las plantas de las otras cinco líneas (9, 28, 53, 65 y 68) la concentración viral fue inferior a la control, acentuándose en las plantas M9.68 ($7,82 \pm 0,51$ ng de virus/mg de tejido). Al igual que ocurría a los 7 d.p.i., en el 12,5% de las plantas M9.65 y M9.68 no encontramos virus. Las plantas M9.36, mostraron una carga viral algo superior a la control ($44,30 \pm 4,64$ ng de virus/mg de tejido).

En las plantas M9.14 y M9.14'-que también poseían concentraciones virales semejantes a la control en la hi a ambos tiempos analizados- calculamos tasas de acumulación viral semejantes en las hs ($64,71 \pm 6,48$ y $61,19 \pm 12,68$ ng de virus/mg de tejido) y, superiores a la de las plantas control. A los 14 d.p.i., la concentración viral de las plantas M9.14 fue similar a la control mientras que, para las plantas M9.14' fue algo inferior ($20,03 \pm 3,03$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.35).

En las plantas de seis líneas M9 (15, 16, 21, 34, 37 y 53) –cuyos contenidos virales en las hi a los 7 d.p.i. eran semejantes: M9.16, M9.21, M9.34, o distintos a la control- la concentración viral a los 7 d.p.i. en la hs fue menor, alcanzando un valor mínimo en las plantas M9.15 ($15,54 \pm 2,00$ ng de virus/mg de tejido). A los 14 d.p.i., a excepción de las plantas M9.15, donde fue comparable a la control, todas ellas mantuvieron una carga viral inferior al control y, la concentración mínima se calculó en las plantas M9.34 ($7,07 \pm 1,06$ ng de virus/mg de tejido). Además, en el 12,5% de las plantas M9.21, no se detectó el virus en ninguno de los dos tiempos analizados. Asimismo, en la línea M9.53, no encontramos virus en el 50 y 62,5% de las plantas, a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.35).

Hojas sistémicas

Línea	7 d.p.i.		14 d.p.i.	
	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	39,13 ± 6,70	100	30,11 ± 4,22
9	100	29,69 ± 5,57	100	21,64 ± 2,62
12	100	30,15 ± 4,55	100	39,85 ± 7,86
14	100	64,71 ± 6,48	100	26,00 ± 4,88
14'	100	61,19 ± 12,68	100	20,03 ± 3,03
15	100	15,54 ± 2,00	100	24,30 ± 4,05
16	100	20,41 ± 2,69	100	11,49 ± 1,27
21	87,5	26,22 ± 5,01	87,5	13,59 ± 1,27
23	100	34,87 ± 4,93	100	34,75 ± 6,36
28	100	37,32 ± 4,05	100	8,32 ± 1,23
34	100	23,24 ± 2,08	100	7,07 ± 1,06
36	100	29,87 ± 4,00	100	44,30 ± 4,64
37	100	23,28 ± 2,70	100	13,94 ± 1,86
45	100	42,47 ± 4,31	100	25,76 ± 4,90
53	50	19,04 ± 1,74	37,5	14,69 ± 1,11
65	87,5	31,93 ± 12,16	87,5	15,64 ± 2,57
68	87,5	36,00 ± 5,85	87,5	7,82 ± 0,51

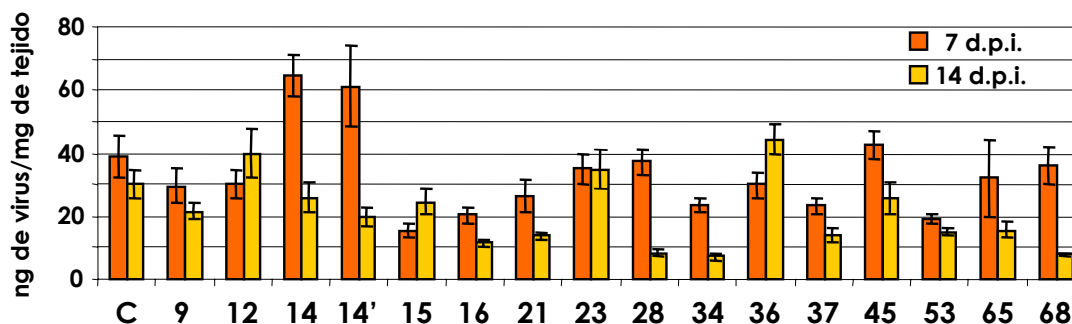


Fig. 3.35. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas sistémicas de plantas M9 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

Los datos obtenidos muestran que las plantas M9 de la generación F0 presentan comportamientos heterogéneos. No obstante, podemos establecer varios grupos:

Las plantas de ocho de las líneas M9 ensayadas (9, 12, 23, 28, 36, 45, 65 y 68), reaccionan frente a la infección viral, a rasgos generales, de manera semejante a las plantas control. No obstante, en las hi de las plantas M9.36 (a los 7 d.p.i.) y M9.68 (a los 14 d.p.i.) y en las hs de las plantas M9.28, M9.65 y M9.68 (a los 14 d.p.i.), encontramos contenidos virales inferiores a los calculados en las plantas control. Además, en las plantas M9.65 y M9.68 se visualizaron síntomas de menor intensidad que los controles.

Por otro lado, en plantas de seis líneas (15, 16, 21, 34, 37 y 53), la expresión constitutiva de la proteína pM9 parece interferir con el establecimiento de la infección sistémica, como indican los menores niveles de acumulación viral encontrados en las hs de estas plantas a los 7 d.p.i., y que se mantienen en cinco de ellas (16, 21, 34, 37 y 53) a los 14 d.p.i. Esto ocurre independientemente de la carga viral encontrada en las hi de las mismas. Los síntomas observados a lo largo de la infección viral en la mayoría de estas plantas fueron similares a los desarrollados por las plantas GUS, sin embargo fueron más suaves en las plantas de dos líneas (16 y 21) a los 14 d.p.i., y el 50% de las plantas M9.53, no los desarrolló en ninguno de los tiempos ensayados.

En las plantas M9.14 y M9.14' la carga viral determinada en las hi fue semejante y en las hs superior a la control a los 7 d.p.i. Este comportamiento podría ser debido a que el estadio de desarrollo de las plantas de estas líneas era menor que el de las otras líneas, lo que las haría más susceptibles a la infección.

3.6.3.- Análisis del efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM9 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Hemos seleccionado dos de estas plantas M9 de la generación F0 (9.1 y 36.7), para analizar en la progenie de las mismas, el efecto de la expresión constitutiva de la proteína pM9 frente a la infección viral.

Así, en la planta M9.9.1, la carga viral calculada en las hi fue similar a la control a los 7 (29,82 ng de virus/mg de tejido) y a los 14 d.p.i. (19,63 ng de virus/mg de tejido). En las hs, la concentración viral fue inferior (12,66 ng de virus/mg de tejido) y semejante (26,59 ng de virus/mg de tejido) a la determinada en las plantas GUS a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. Además, la sintomatología desarrollada por las mismas fue semejante a la control.

En la planta M9.36.7, la carga viral en las hi fue inferior a la control a los 7 y 14 d.p.i.: 11,67 y 21,94 ng de virus/mg de tejido, respectivamente. En las hs, la concentración viral a los 7 d.p.i. fue semejante (42,67 ng de virus/mg de tejido) y, a los 14 d.p.i. inferior (37,68 ng de virus /mg de tejido) a la control. La sintomatología desarrollada por esta planta fue indistinguible a la de los controles.

Como controles usamos plantas GUS.

3.6.3.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

En las plantas control los síntomas de moteado y aclaramiento de venas, aparecieron en la 2ª h.p.e.i. a partir del 5-7º d.p.i. No obstante, no desarrollaron síntomas el 25% de estas plantas.

En el 37,5% y en el 62,5% de las plantas M9.9.1 y M9.36.7 no observamos síntomas a los 7 d.p.i.. En las demás plantas M9.9.1 los síntomas fueron similares a los de plantas control; mientras que los visualizados en el resto de las plantas M9.36.7 aunque visibles a partir de la 2ª h.p.e.i., eran de menor intensidad que los desarrollados por los controles.

A los 14 d.p.i. el 100% de las plantas control apreciamos síntomas más intensos a partir de la 3-4ª h.p.i.

Las plantas M9 desarrollaron síntomas de intensidad semejante a los manifestados por las plantas control a partir de la 3-4ª h.p.e.i., excepto el 12,5% de las plantas M9.36.7 que no mostraron síntomas.

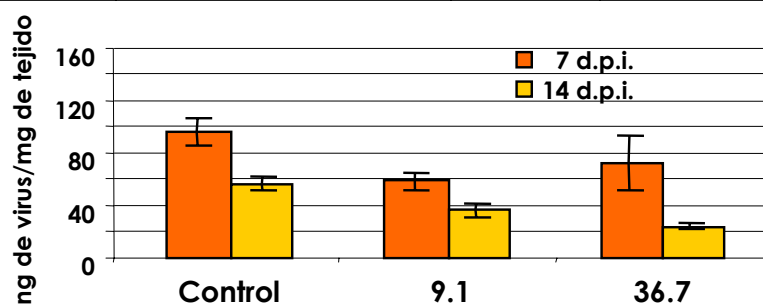
3.6.3.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral calculada en las hi de las plantas control fue de $96,32 \pm 10,23$ y $56,46 \pm 5,01$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

En las plantas M9.9.1, la carga viral fue inferior a la control a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente ($58,28 \pm 6,24$ y $36,64 \pm 5,14$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente) (Fig. 3.36), mientras que en las plantas M9.36.7, la tasa de acumulación viral fue parecida a la control a los 7 d.p.i., pero inferior a los 14 d.p.i. ($23,84 \pm 2,19$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.36).

Hojas inoculadas

Línea	% plantas	7 d.p.i.		14 d.p.i.	
		ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas
C	100	96,32 ± 10,23	100	56,46 ± 5,01	
9.1	100	58,28 ± 6,24	100	36,64 ± 5,14	
36.7	100	72,33 ± 20,69	100	23,84 ± 2,19	



Hojas sistémicas

Línea	% plantas	7 d.p.i.		14 d.p.i.	
		ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas
C	100	59,69 ± 6,68	100	47,58 ± 3,34	
9.1	100	80,90 ± 16,70	100	17,97 ± 3,43	
36.7	100	112,05 ± 30,96	100	25,05 ± 3,74	

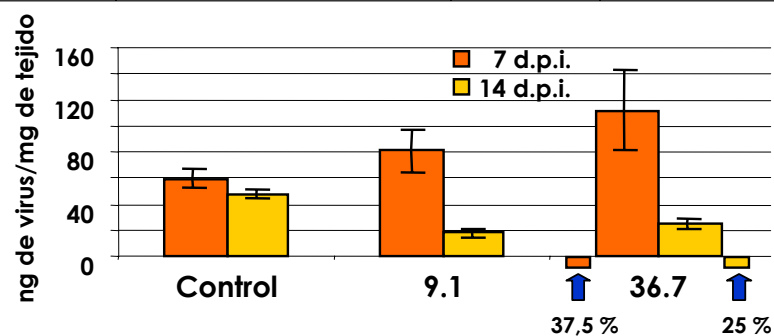


Fig. 3.36. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de las plantas M9 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Los datos representan la media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.6.3.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

La concentración viral determinada en las hs de las plantas control fue de $59,69 \pm 6,68$ y $47,58 \pm 3,41$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

En las plantas de la línea M9.9.1, la tasa de acumulación viral fue semejante a la control a los 7 d.p.i., pero inferior a los 14 d.p.i (Fig. 3.36).

En las plantas M9.36.7, a los 7 d.p.i, los niveles de acumulación viral en estas hojas fueron superiores ($60,06 \pm 6,11$ ng de virus/mg de tejido) a los de las plantas control en el 62,5% de las mismas; pero a los 14 d.p.i., en el 75% fueron inferiores ($25,05 \pm 3,97$ ng de virus/mg de tejido). Finalmente, no detectamos CMV-24 en el 37,5 y el 25% de las plantas a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

Los datos obtenidos mediante los ensayos de ELISA revelan que la expresión constitutiva de la proteína pM9 en las plantas de tabaco produce una disminución de las tasas de acumulación viral en las hi de todas las plantas M9.9.1 y de algunas plantas M9.36.7, así como una inhibición de la invasión sistémica en el caso de las plantas de la línea M9.36.7, ya que en algunas de ellas no se pudo detectar el virus en ninguno de los dos tiempos analizados. En ambos tipos de hojas, el contenido viral a los 14 d.p.i. es considerablemente inferior al de las plantas control, lo que podría indicar que la expansión viral en las mismas es limitada. A su vez, estos datos se corresponden con la atenuación de los síntomas observada.

3.6.4. Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M9

Con el fin de analizar si la menor carga viral calculada en las hi de todas las plantas M9.9.1 y de algunas plantas M9.36.7 estaba asociada con una disminución de la invasión de CMV-24 y determinar el patrón de invasión viral en estas plantas, hemos llevado a cabo la detección del virus a los 3 y 5 d.p.i. en improntas de tejido (aptdo. 2.2.18 de M. y M.). Así, hemos inoculado la primera hoja desarrollada de dos plantas GUS, tres plantas M9.9.1 y tres plantas M9.36.7, para analizarlas en cada uno de los tiempos ensayados. El RNA viral fue detectado con la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24.

A los 3 d.p.i., en todas las plantas ensayadas encontramos los RNAs virales sólo en las hi, aunque el nº, intensidad y expansión de los focos de infección en las plantas control GUS fueron significativamente superiores a los de las plantas M9 (Fig. 3.37).

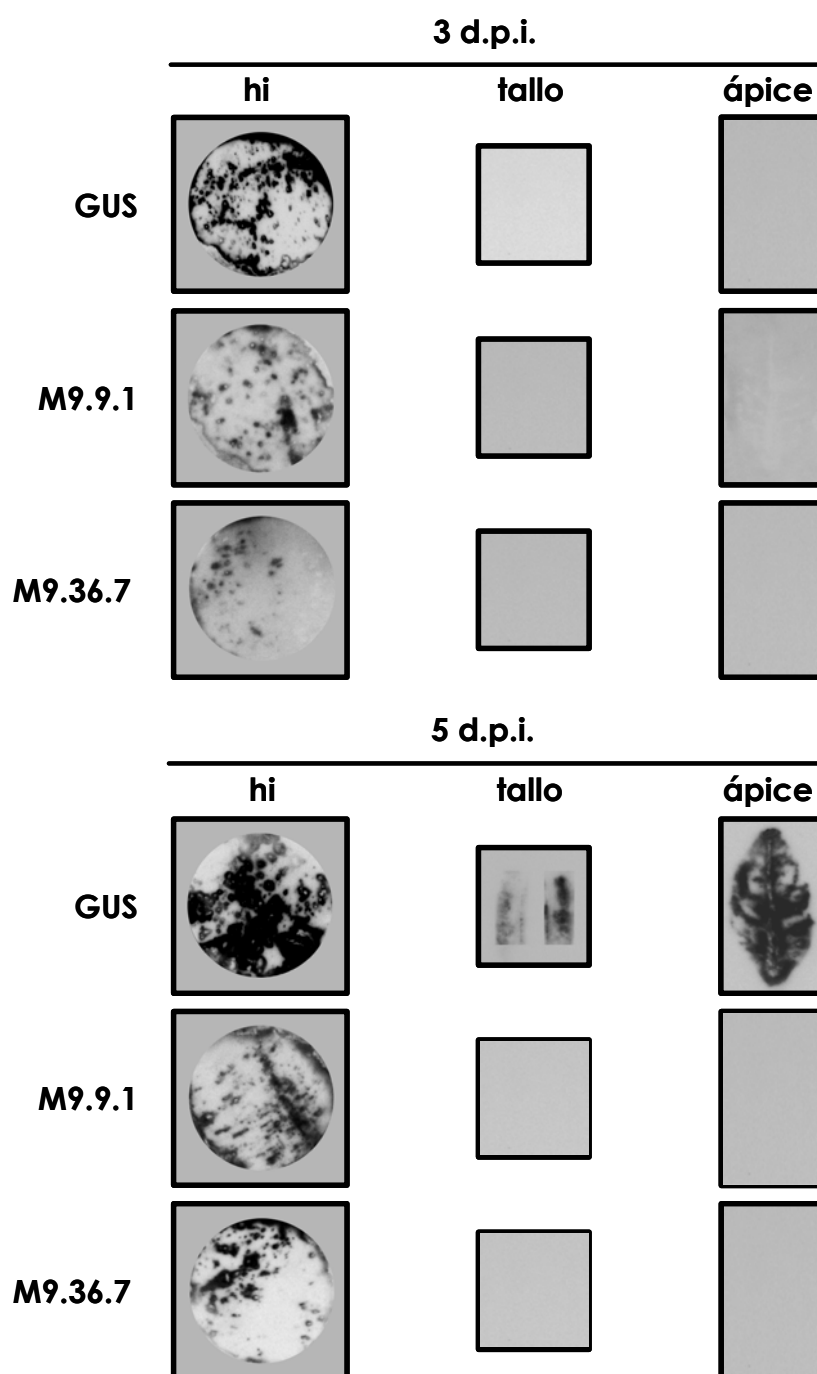


Fig. 3.37. Análisis de la distribución de los RNAs de CMV-24 en las hi, tallos y ápices de las plantas control GUS y de las plantas M9.9.1 y M9.36.7 en los tiempos indicados en la figura. hi: hoja inoculada

A los 5 d.p.i., en las plantas control detectamos el virus en la hi, en el tallo y a partir de la 2ª h.p.e.i. (Fig. 3.37 y datos no mostrados). En una de las tres plantas M9.36.7, al igual que en las plantas control, encontramos virus en la hi, en el tallo y en

el ápice; sin embargo, la intensidad de las señales de hibridación fue mucho menor que en el caso de los controles (Fig. 3.37 y datos no mostrados). Además, a diferencia de las plantas control, en ésta no detectamos virus en ninguna de las h.p.e.i.. Por otro lado, en este tiempo, sólo hallamos el virus en las hi de las tres plantas M9.9.1 y de las dos plantas M9.36.7 restantes, con un patrón de acumulación similar al anteriormente descrito para las hi de la planta M9.36.7 (Fig. 3.37 y datos no mostrados).

Estos resultados indican que las menores tasas de acumulación viral encontradas en las plantas M9 son debidas a la existencia de un menor nº de células infectadas en las hojas inoculadas y, por tanto, la expresión de la proteína pM9 está interfiriendo con los procesos iniciales de la infección viral. Además observamos que la invasión sistémica se ve retrasada y/o impedida en estas plantas.

3.7.- Caracterización de las plantas M10

3.7.1.- Caracterización del transgén M10

En análisis anteriores llevados a cabo con plantas M10 de las líneas M10.9 y M10.45, no fue posible detectar la proteína pM10 aunque sí el RNA M10 (Sanz, 1996). Por ello, en el presente trabajo expandimos nuestros análisis a nueve plantas M10 correspondientes a tres líneas M10 independientes de la generación F1: 17.3, 51.1 y 56.4, y analizamos el contenido del transgén y de su proteína mediante ensayos de Northern y Western blot, respectivamente. Éstos revelaron la presencia del RNA M10 en todas las plantas M10 (Fig. 3.38), siendo la intensidad de la señal de hibridación heterogénea entre las plantas pertenecientes a una misma línea. Por el contrario, y al igual que en los experimentos previos, no detectamos la proteína pM10 en ninguna de estas plantas (datos no mostrados).

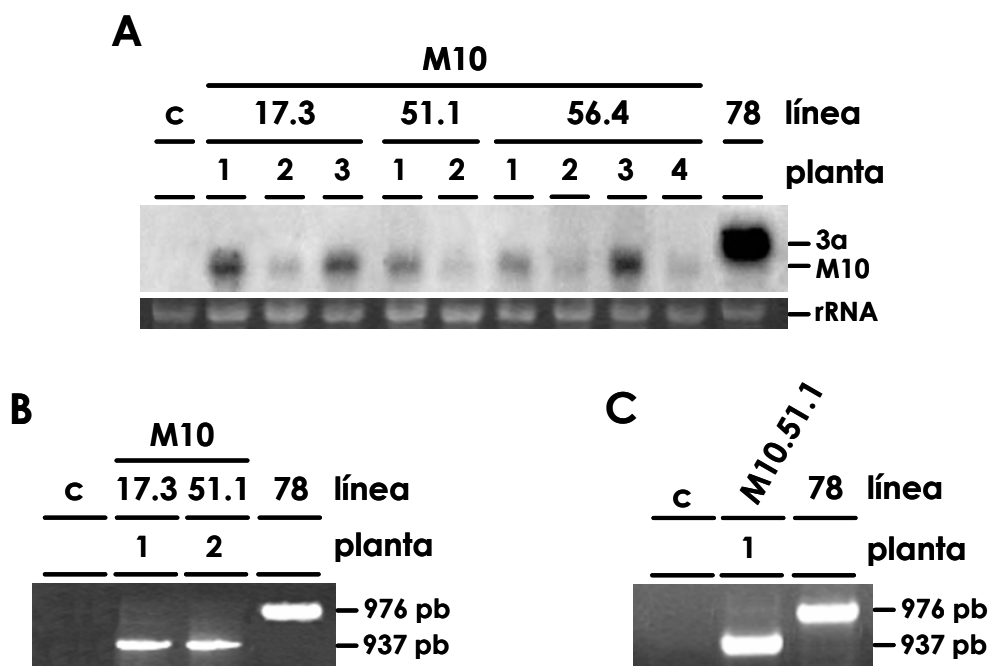


Fig. 3.38 A. Análisis, mediante ensayos de Northern blot, de la acumulación del mRNA en las plantas M10.17.3, M10.51.1 y M10.56.4. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados. En el panel inferior se muestra la tinción con BrEt del rRNA 18S.

B. Análisis, mediante RT-PCR de los RNAs derivados de los transgenes de las plantas M10.17.3, M10.51.1 y 78. y **C.** Análisis, mediante PCR, del DNA correspondiente al transgén de las plantas M10.51.1 y 78. El tamaño de las bandas obtenidas se indica a la derecha de la figura. c: plantas control GUS; 78: plantas 3a de la línea 78. Los números situados encima de los carriles indican los distintos individuos analizados.

Con el fin de dilucidar si la falta de la proteína era debida a alguna mutación en la región codificadora, analizamos la secuencia nucleotídica parcial del RNA M10 así como del transgén correspondiente. Para ello, los RNAs totales de las plantas M10.17.3.1 y M10.51.1.1 así como de las plantas control GUS y 78, fueron amplificados mediante RT-PCR usando los cebadores 131 y 135 (aptdo 2.1.5, 2.2.13, 2.2.14 de M. y M.). El análisis electroforético de los productos de reacción (Fig. 3.38) reveló la presencia de una banda de DNA de 976 pb en la muestra de la planta 78, que corresponde al transgén 3a y una banda de 937 pb en las dos plantas M10. La amplificación de los RNAs de las plantas GUS no originó ninguna banda, indicando la especificidad de la reacción.

Asimismo, el DNA de las plantas GUS, 78 y M10.51.1.1 fue amplificado mediante PCR utilizando la misma pareja de cebadores. El análisis electroforético de los productos de reacción produjo bandas de DNA sólo en las muestras correspondientes a la planta 78 y M10.51.1.1 (Fig. 3.38), y de iguales tamaños a las anteriores.

A continuación, establecimos las secuencias nucleotídicas de las distintas bandas de amplificación obtenidas a partir del RNA y del DNA de las plantas M10. Su análisis mostró que en el nt 238 (numeración correspondiente al RNA 3 de CMV-24) una G era reemplazada por una A, dando lugar a la sustitución del triplete UGG (Trp)→UGA (Ter). La presencia de este codon de terminación (UGA) originaría una proteína truncada de 46 aa que no era detectada en nuestros análisis.

3.7.2.- Análisis del efecto de la expresión del transgén M10 en plantas de tabaco de la generación F0 frente a la infección de CMV-24

Llevamos a cabo el seguimiento de la infección de CMV-24 en veinte líneas de plantas transgénicas de tabaco de la generación F0 que expresan constitutivamente las secuencias M10: 1, 4, 9, 12, 14, 17, 19, 20, 21, 26, 45, 46, 51, 54, 56, 61, 62, 63, 65 y 90. Como en los ensayos anteriores, usamos como control plantas GUS.

3.7.2.1.- Seguimiento de la sintomatología a lo largo de la infección viral

Tras la inoculación, las plantas GUS mostraron síntomas de moteado y aclaramiento de venas en la 2-3ª h.p.e.i. a partir del 5º-7º d.p.i.

Las plantas de diez de las veinte líneas M10 ensayadas (12, 14, 20, 21, 26, 45, 54, 56, 63 y 90) desarrollaron una sintomatología similar a la observada en las plantas

control. No obstante, no visualizamos síntomas en el 25 y en el 62,5% de las plantas M10.14 y M10.26, respectivamente.

En las plantas de las otras diez líneas M10 (1, 4, 9, 17, 19, 46, 51, 61, 62 y 65) los síntomas eran de menor intensidad que los controles. Además, en el 87,5% de las plantas M10.4 no los desarrollaron.

A los 14 d.p.i. se acentuaron los síntomas de moteado y aclaramiento de venas en las plantas control y aparecían a partir de la 4ª h.p.e.i..

A este tiempo, las plantas de todas las líneas M10 ensayadas desarrollaron síntomas de intensidad similar a los controles pero, no observamos síntomas en el 25 y el 75% de las plantas M10.14 y M10.4, respectivamente.

3.7.2.2.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

La acumulación viral en las hi de las plantas control fue de $66,72 \pm 8,34$ y $14,48 \pm 1,02$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.39).

En plantas de doce líneas M10 (9, 14, 19, 20, 26, 45, 46, 51, 54, 61, 65 y 90), la carga viral calculada a los 7 d.p.i. fue semejante a la de las plantas control. A los 14 d.p.i., también fue similar en las plantas de cinco de estas líneas M10 (14, 45, 54, 61 y 90) y superior en las plantas de las otras siete líneas (9, 19, 20, 26, 46, 51 y 65), acentuándose en las plantas M10.26 ($38,14 \pm 4,63$ ng de virus/mg de tejido) (Fig. 3.39).

En las plantas de cinco líneas M10 (4, 12, 17, 62 y 63) la concentración viral en las hi a los 7 d.p.i. fue inferior a la control, siendo más acusada la diferencia en las plantas M10.4 y M10.62 ($30,28 \pm 4,90$ y $32,70 \pm 2,96$ ng de virus/mg de tejido, respectivamente). A los 14 d.p.i., las plantas M10.62 mantenían el comportamiento anterior ($11,68 \pm 0,64$ ng de virus/mg de tejido) mientras que en las demás, la acumulación viral fue semejante (M10.4 y M10.17) o superior (M10.12 y M10.63) a la control. Por otro lado, en el 62,5% y en el 25% de las plantas M10.4 y M10.17, respectivamente, no detectamos el virus (Fig. 3.39).

Finalmente en las hi de las plantas de tres líneas M10 (1, 21 y 56), la concentración viral determinada a los 7 d.p.i. fue superior a la control ($101,73 \pm 25,30$ ng de virus/mg de tejido), aunque no encontramos virus en el 12,5% de las plantas M10.1 y M10.21. A los 14 d.p.i., todas las plantas M10.21 mostraron una carga viral algo superior ($19,76 \pm 1,20$ ng de virus/mg de tejido) a la control, mientras que fue similar en las plantas M10.1 y M10.56 (Fig. 3.39).

Hojas inoculadas

Línea	7 d.p.i.		14 d.p.i.	
	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	66,72 ± 8,34	100	14,48 ± 1,02
1	87,5	92,43 ± 13,36	100	16,57 ± 2,00
4	100	30,28 ± 4,90	37,5	16,78 ± 1,72
9	100	88,22 ± 17,54	100	17,06 ± 1,23
12	100	46,33 ± 6,78	100	20,45 ± 3,96
14	100	59,43 ± 14,55	100	16,86 ± 2,65
17	100	46,05 ± 4,54	75	14,88 ± 1,53
19	100	53,30 ± 6,27	100	19,80 ± 1,25
20	100	51,72 ± 7,65	100	35,52 ± 3,60
21	87,5	101,73 ± 25,30	100	19,76 ± 1,20
26	100	61,96 ± 5,36	100	38,14 ± 4,63
45	100	75,85 ± 12,49	100	13,95 ± 0,83
46	100	48,49 ± 12,15	100	22,73 ± 2,39
51	100	72,89 ± 6,91	100	21,33 ± 1,19
54	100	51,16 ± 6,72	100	12,87 ± 0,48
56	100	103,29 ± 18,83	100	14,99 ± 0,16
61	100	53,91 ± 5,87	87,5	12,30 ± 1,91
62	100	32,70 ± 2,96	100	11,68 ± 0,64
63	100	46,77 ± 6,12	100	37,92 ± 2,51
65	100	57,00 ± 9,20	100	18,80 ± 1,86
90	100	64,75 ± 12,03	100	14,82 ± 0,13

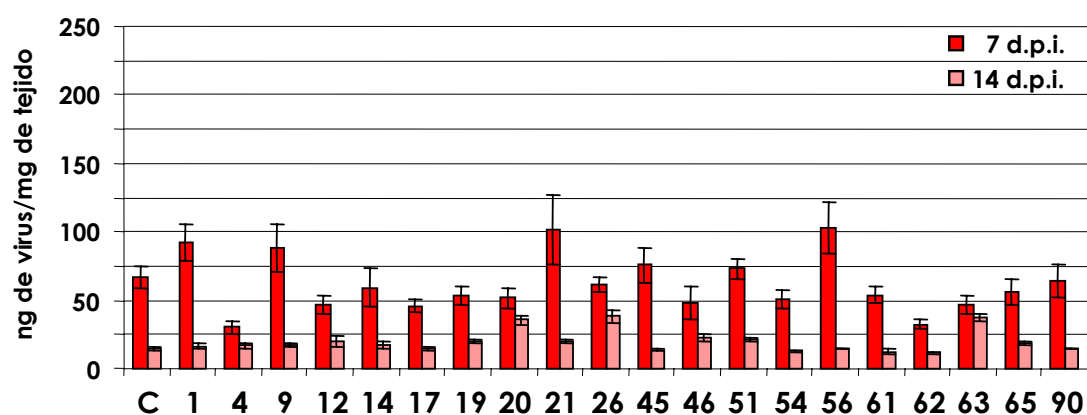


Fig. 3.39. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M10 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.7.2.3.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

En las hs de las plantas control, la acumulación viral fue de $122,14 \pm 29,15$ y $19,06 \pm 2,12$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente (Fig. 3.40).

En las hojas correspondientes de plantas de diez líneas M10, la carga viral a los 7 d.p.i. fue semejante (12, 14, 20, 26, 45, 54, 56, 63, y 90) o ligeramente superior (21) a la control. Sin embargo, en el 25% y en el 62,5% de las plantas M10.14 y M10.26, respectivamente, no detectamos el virus. A los 14 d.p.i., en las plantas de todas estas líneas, la acumulación viral determinada fue menor o igual que la control. Además, en el 25% y 12,5% de las plantas M10.14 y M10.45, respectivamente, no encontramos virus (Fig. 3.40).

Al igual que ocurría en las hi, el contenido viral de las hs a los 7 d.p.i. de las líneas M10.4, M10.17, M10.62 fue inferior al de las plantas control. También fue menor en las hs de las plantas de otras siete líneas M10 (1, 9, 19, 46, 51, 61, y 65), alcanzando un valor mínimo en las plantas M10.51 ($13,00 \pm 1,31$ ng de virus/mg de tejido). Hay que destacar que no hallamos el virus en el 87,5% de las plantas M10.4. A los 14 d.p.i., y a excepción de las plantas de tres líneas M10 (4, 17 y 19) donde la carga viral fue semejante a la control, todas mantuvieron contenidos inferiores. A este tiempo, no se detectó el virus en el 75% de las plantas M10.4 ni en el 12,5% de las plantas M10.9 y M10.61 (Fig. 3.40).

Según los datos obtenidos en las plantas pertenecientes a las diferentes líneas M10 de generación F0, podemos establecer comportamientos heterogéneos frente a la infección viral. En ocho líneas (12, 20, 21, 45, 54, 56, 63 y 90) no se detectaron diferencias significativas respecto a las plantas control, a excepción de un mayor contenido en virus en las hi de las plantas M10. 21 y M10.56 y en las hs de las plantas M10.21 y M10.90, a los 7 d.p.i.. En las otras doce líneas M10 (1, 4, 9, 14, 17, 19, 26, 46, 51, 61, 62 y 65) detectamos un efecto inhibitorio en el establecimiento de la infección sistémica. Este comportamiento aparecía principalmente a los 7 d.p.i., manifestándose

mediante la ausencia o atenuación de los síntomas, y en una menor acumulación viral o ausencia de virus en las hs de estas plantas. Así, no detectamos el virus en el 82,5 ni en el 62,5% de las plantas M10.4 y M10.26, respectivamente, a los 7 d.p.i.; ni en el 75% de las plantas M10.4, a los 14 d.p.i. y tampoco en el 25% de las plantas M10.14 a los dos tiempos ensayados. Este efecto era independiente de las tasas de acumulación viral calculadas en las hi de las plantas, lo que indicaba que el efecto de la expresión de las secuencias M10 en las mismas actuaba esencialmente sobre el movimiento a larga distancia viral.

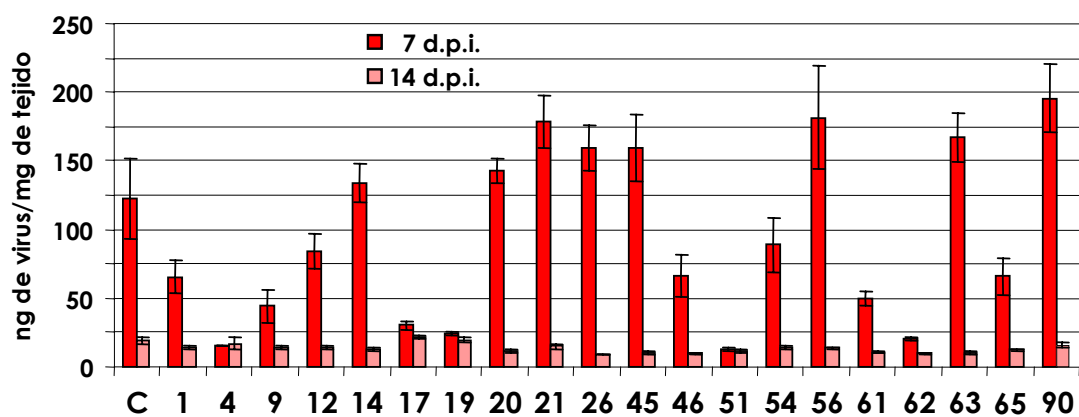
Fig. 3.40. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas de plantas M10 pertenecientes a la generación F0 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma

Hojas sistémicas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	122,14 ± 29,15	100	19,06 ± 2,12
1	100	65,35 ± 12,28	100	14,45 ± 1,14
4	12,5	15,47 ± 0,00	25	16,97 ± 4,41
9	100	44,34 ± 12,18	87,5	13,93 ± 1,72
12	100	84,60 ± 12,64	100	14,24 ± 0,94
14	75	133,84 ± 14,24	75	13,03 ± 1,47
17	100	30,10 ± 3,20	100	21,74 ± 1,49
19	100	24,25 ± 1,48	100	19,42 ± 1,79
20	100	143,21 ± 8,82	100	11,42 ± 0,70
21	100	178,27 ± 18,91	100	15,02 ± 1,81
26	37,5	159,51 ± 16,60	100	9,14 ± 0,40
45	100	159,81 ± 24,05	87,5	9,74 ± 1,33
46	100	66,38 ± 15,27	100	9,62 ± 0,68
51	100	13,00 ± 1,31	100	11,31 ± 0,85
54	100	88,76 ± 19,54	100	13,48 ± 1,34
56	100	181,65 ± 37,23	100	13,43 ± 0,64
61	100	49,39 ± 5,37	87,5	10,65 ± 0,40
62	100	20,78 ± 1,11	100	10,05 ± 0,70
63	100	167,23 ± 17,45	100	10,22 ± 0,82
65	100	65,97 ± 13,37	100	12,46 ± 0,78
90	100	195,78 ± 24,67	100	15,61 ± 1,65



3.7.3.- Análisis del efecto de la expresión del transgén M10 en plantas de tabaco de la generación F1 frente a la infección de CMV-24

Seleccionamos tres de estas plantas: M10.17.3, M10.51.1 y M10.56.4, en base al comportamiento mostrado frente a la infección por CMV-24, para analizar en la progenie de las mismas, el efecto de la expresión del transgén M10 frente a la infección viral.

Así, en la planta M10.17.3 sólo detectamos el virus en las hi a los 7 d.p.i. en concentraciones inferiores a la control (31,92 ng de virus/mg de tejido). En la planta M10.51.1 la carga viral calculada en las hi a los 7 d.p.i. fue superior (89,1076 ng de virus/mg de tejido) mientras que, a los 14 d.p.i., fue semejante. En las hs, el contenido viral determinado fue menor que en los controles: 17,17 y 8,96 ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. En la planta M10.56.4 la carga viral encontrada en las hojas inoculadas y sistémicas en ambos tiempos fue semejante a la control.

Las tres plantas desarrollaron síntomas de menor intensidad que los de plantas control a los 7 d.p.i., aunque a los 14 d.p.i. la sintomatología fue similar.

Como controles del experimento usamos plantas GUS.

3.7.3.1.- Acumulación viral en las hojas inoculadas

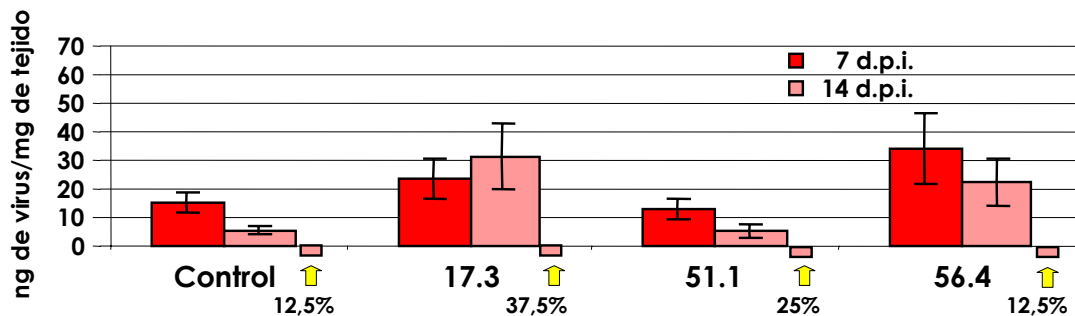
En este ensayo, la acumulación viral en las hi de las plantas control fue de $15,35 \pm 3,40$ ng y $5,46 \pm 1,62$ de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente. A este último tiempo, no detectamos el virus en el 12,5% de las plantas (Fig. 3.41).

En las hi de las plantas M10.17.3 y M10.51.1, la carga viral a los 7 d.p.i. fue semejante a control. A los 14 d.p.i., mantuvieron este comportamiento el 75% de las plantas M10.51.1, mientras que el 62,5% de las plantas M10.17.3 mostraron una acumulación viral superior ($31,18 \pm 11,48$ ng de virus/mg de tejido). En este tiempo, no encontramos virus en el 25 y 37,5% de las plantas M10.51.1 y M10.17.3, respectivamente (Fig. 3.41).

Finalmente, en las hi de las plantas M10.56.4, el contenido viral calculado a los 7 d.p.i. ($34,207 \pm 12,267$ ng de virus/mg de tejido) y 14 d.p.i. ($22,58 \pm 8,24$ ng de virus/mg de tejido) fue superior al control. Por otro lado, en este tiempo no hallamos CMV-24 en el 12,5% de las mismas.

Hojas inoculadas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	15,35 ± 3,40	87,5	5,46 ± 1,62
17.3	100	23,58 ± 6,90	62,5	31,18 ± 11,48
51.1	100	13,18 ± 3,57	75	5,30 ± 2,17
56.4	100	34,21 ± 12,27	87,5	22,58 ± 8,24



Hojas sistémicas

7 d.p.i.			14 d.p.i.	
Línea	% plantas	ng de virus/mg de tejido*	% plantas	ng de virus/mg de tejido*
C	100	5,99 ± 1,17	100	37,10 ± 14,02
17.3	37,5	25,42 ± 8,01	62,5	25,04 ± 4,29
51.1	12,5	9,62 ± 0,00	50	24,53 ± 4,02
56.4	50	50,35 ± 12,08	100	34,04 ± 4,35

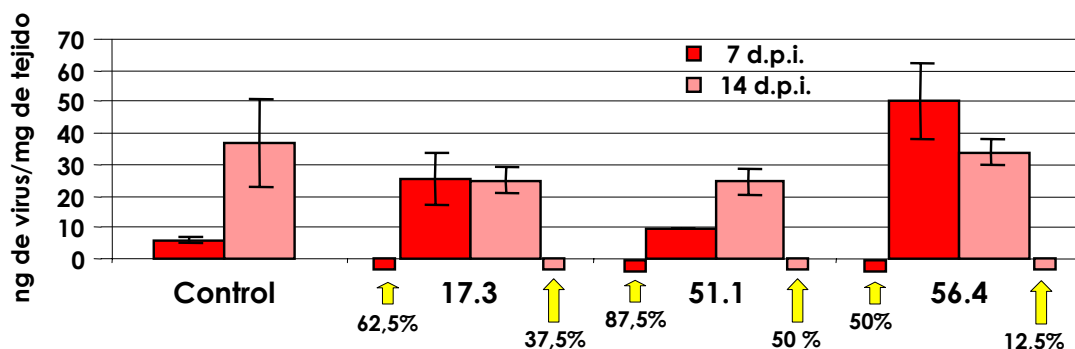


Fig. 3.41. Cuantificación de la CP, mediante ensayos de ELISA-DAS, en las hojas inoculadas y sistémicas de plantas M10 pertenecientes a la generación F1 a los 7 y 14 d.p.i., y representación gráfica de la misma. % plantas: porcentaje de plantas de cada línea donde detectamos virus; C: plantas control GUS.

(*) Media aritmética de los valores calculados para las plantas de cada línea y su error estándar.

El porcentaje de plantas en el que no se detectó virus se muestran debajo del eje de abscisas.

Las distintas líneas de plantas analizadas se indican en la base del histograma.

3.7.3.2.- Acumulación viral en las hojas sistémicas

Según se muestra en la Fig. 3.41, la carga viral de las hs de las plantas control fue de $5,99 \pm 1,17$ y $37,10 \pm 14,02$ ng de virus/mg de tejido a los 7 y 14 d.p.i., respectivamente.

A los 7 d.p.i., no encontramos virus en un porcentaje elevado de plantas pertenecientes a las tres líneas ensayadas: el 50, 62,5 y 87,5% de las plantas M10.56.4, M10.17.3 y M10.51.1. En las demás plantas pertenecientes a estas líneas la carga viral fue semejante (M10.17.3 y M10.56.4) o inferior (M10.51.1) a la control. A los 14 d.p.i., el porcentaje de plantas donde no detectamos el virus se redujo: 12,5, 37,5 y 50% de las plantas M10.56.4, M10.17.3 y M10.51.1, respectivamente. Las plantas restantes mostraron una concentración viral similar a la control.

Estos datos corroboran en parte los resultados obtenidos en la generación F0 y ponen de manifiesto que el RNA M10 o bien la proteína pM10 de 46 aa ejercen un efecto inhibitorio sobre el movimiento sistémico del virus, de forma que en algunas de las plantas no fue posible encontrarlo en las hojas sistémicas en ninguno de los dos tiempos analizados.

3.7.3.- Análisis del patrón de infección de CMV-24 en plantas M10

Con el fin de analizar el patrón de invasión viral en las plantas M10, llevamos a cabo la detección del virus a los 3 y 7 d.p.i. en improntas de tejido (aptdo 2.2.18 de M. y M.). Para ello, inoculamos con CMV-24 la primera hoja desarrollada de cuatro plantas GUS y seis plantas M10.51.1, de forma que analizamos 2 y 3 plantas de cada línea en cada uno de los tiempos de interés. El RNA viral fue detectado con la ribosonda específica de la región 3'-NC del RNA de CMV-24.

A los 3 d.p.i., en todas las plantas detectamos los RNAs virales sólo en las hi, y no observamos diferencias significativas en las señales de hibridación (Fig. 3.42).

A los 7 d.p.i., encontramos el virus en las hi, hs, tallo y ápice de las dos plantas GUS ensayadas, y a partir de la 2ª h.p.e.i. (Fig 3.42). En todas las plantas M10, encontramos virus en la hi y, al igual que a los 3 d.p.i., el nº y tamaño de los focos de infección fueron similares a los hallados en las plantas control. Por otro lado, una de las plantas M10 mostró un patrón de infección viral similar a las plantas GUS mientras que, en las dos restantes no detectamos el virus en los tejidos sistémicos (Fig. 3.42).

Estos datos, que corroboran los obtenidos mediante ensayos de ELISA-DAS, indican que la expresión de secuencias del RNA M10 o del péptido codificado actúan como inhibidores de la invasión sistémica pero no tienen ningún efecto a nivel local.

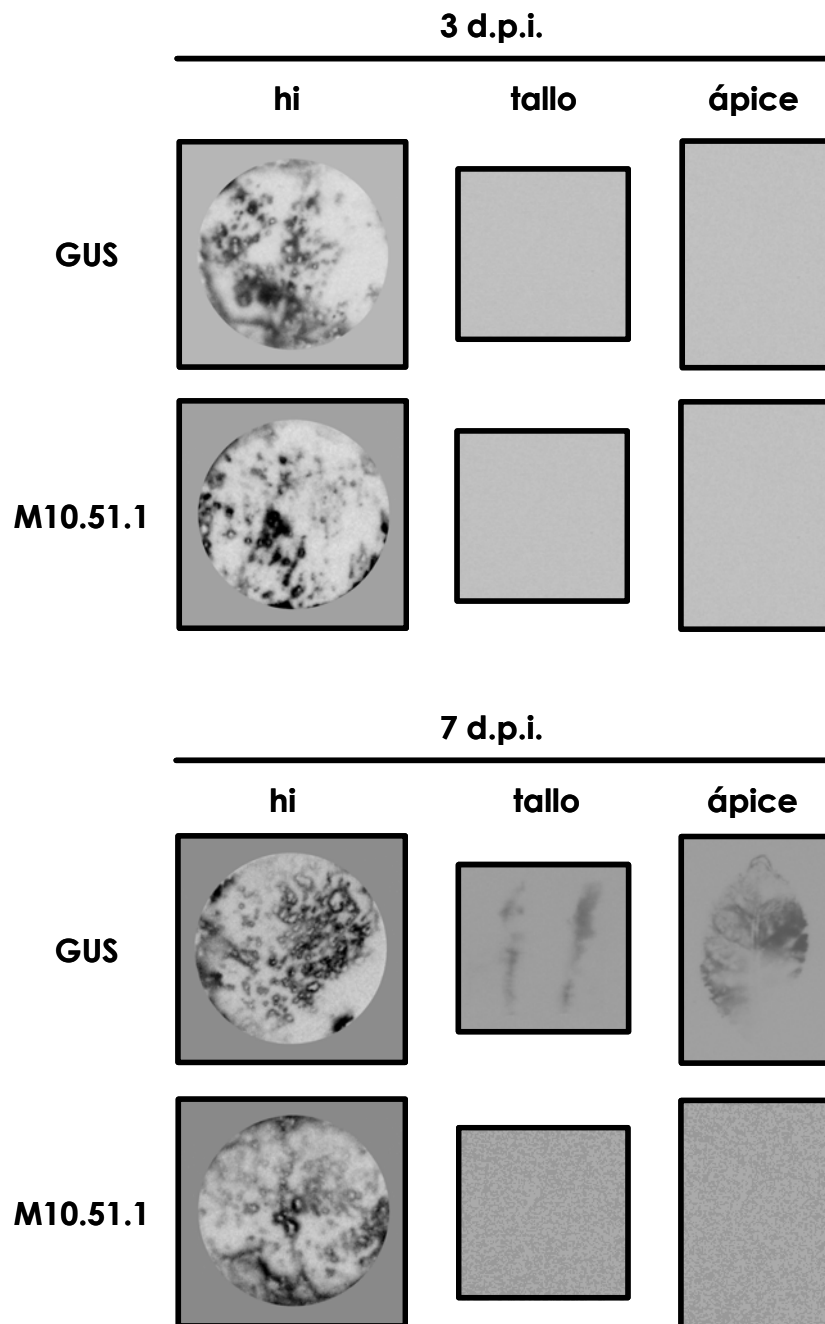


Fig. 3.42. Análisis de la distribución de los RNAs de CMV-24 en las hi, tallos y ápices de las plantas control GUS y de las plantas M10.51.1 en los tiempos indicados en la figura. hi: hoja inoculada

3.8.- Distribución subcelular de las diferentes proteínas deleccionadas

En análisis previos se ha determinado que las proteínas p3a y pM2, expresadas transgénicamente en plantas de tabaco 78 y M2, respectivamente, se localizan principalmente en la fracción de pared celular de las hojas maduras (Vaquero y col., 1994; Sanz, 1996).

Para determinar si las diferentes delecciones llevadas a cabo en la proteína p3a afectaban a su localización subcelular, realizamos el fraccionamiento del tejido -según se describe en el aptdo 2.2.19 de M. y M.- de plantas M3, M5, M6, M8 y M9 que expresaban constitutivamente dichas proteínas. Como controles del experimento usamos plantas 78.

Los ensayos de Western blot, realizados a partir las diferentes fracciones obtenidas y utilizando el suero anti 3a, revelaron la presencia de los diferentes mutantes de delección en la fracción de pared celular (Fig. 3.X y datos no mostrados). La movilidad electroforética de estas proteínas era mayor que la de la proteína 3a expresada en las plantas 78, indicativa de su menor tamaño y de que ninguna delección afectaba a su localización.

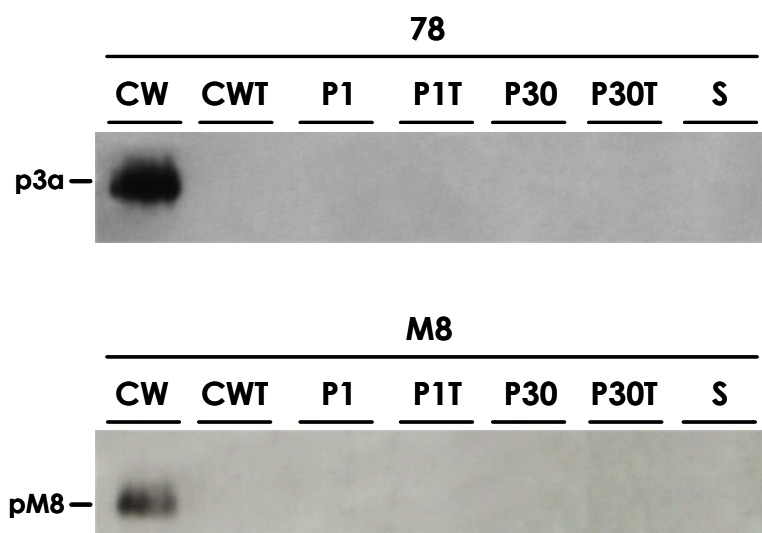


Fig. 3.43. Análisis, mediante ensayos de Western-blot, de la localización subcelular de las proteínas p3a y pM8 expresadas transgénicamente en las hojas maduras de las plantas 78 y M8, respectivamente. Las muestras CW, P1 y P30 corresponden a las fracciones insolubles en Triton: CW, fracción enriquecida en pared celular; P1, sedimento a 1000 g; sedimento a 30.000 g. CWT, P1T y P30T indican las fracciones solubles en Triton-100. S es el sobrenadante a 30.000 g.

3.9.- Predicción estructural de la proteína p3a

La predicción de la estructura secundaria de la proteína p3a reveló que podría poseer un 17,5% de estructura de α -hélice y un 23% de estructura β . La distribución de esta estructura secundaria a lo largo de la proteína sería todo- α , todo- β y α , para las regiones amino, central y carboxi de la misma (Fig. 3. 44).

Con el fin de establecer un posible modelo tridimensional de la proteína p3a, usamos 5 métodos diferentes de predicción (aptdo. 2.2.23 de M. y M.). Sin embargo, dichos análisis no arrojaron ningún modelo concluyente. De igual forma, la búsqueda de dominios transmembrana con programas específicos mostró un único dominio – aunque con una probabilidad estadística muy baja- entre los aa 160-183, lo cual podría indicar que en esta región existe una zona de inserción en la membrana.



Fig. 3.44. Predicción de la estructura secundaria de la proteína p3a de CMV-24.

: hélice; : cadena; : espiral; AA: secuencia

4.- DISCUSIÓN

La invasión generalizada de la planta por los virus conlleva el transporte a través de los distintos tipos de células y tejidos, con requerimientos diversos para cada uno de ellos. De hecho, cada tipo celular representa una barrera para el movimiento, por lo que se puede considerar que esta limitación es uno de los mecanismos de defensa vegetal (Dawson y Hilf, 1992; Gilbertson y Lucas, 1996). Para contrarrestarlos, los virus han desarrollado diversas estrategias entre las que se encuentran la incorporación de las proteínas de movimiento en el genoma. Su estudio ha abierto nuevas fronteras en la biología celular y del desarrollo. Para algunos autores, los virus han podido adquirir estas proteínas del huésped de forma que pueden reproducir procesos biológicos como el transporte y/o la traslocación de macronutrientes y señales.

En este contexto, el presente trabajo se ha centrado en la caracterización funcional de una serie de mutantes de delección de la proteína p3a de CMV, así como en el análisis de su capacidad para conferir resistencia a plantas de tabaco cuando son expresadas constitutivamente.

De los siete mutantes ensayados, detectamos el mRNA del transgén y su correspondiente proteína en las líneas de plantas transformadas con seis de ellos: M2, M3, M5, M6, M8 y M9. Sin embargo, en las plantas pertenecientes a las 23 líneas M10 analizadas únicamente detectamos el mRNA transgénico (Fig. 3.38A y datos no mostrados). Según revelaron los análisis de las secuencias del DNA transgénico y de su mRNA, la no detección de la hipotética proteína pM10 era debida a que en esta construcción la G238 del RNA 3 de CMV-24 había sido reemplazada por una A, sustituyendo en la ORF de la p3a el triplete UGG (Trp47)→UGA (Ter) que codificaría una proteína truncada de 46 aa y que no podía ser detectada en nuestros análisis. Esta mutación fue encontrada en las plantas de dos líneas independientes indicando que tuvo lugar durante el proceso de manipulación del DNA, anterior a la transformación de las plantas (Fig. 3.38 B y C).

En el análisis del contenido de la proteína y mRNAs transgénicos encontramos una elevada heterogeneidad en los niveles de expresión de los transgenes y la acumulación de sus respectivas proteínas, tanto entre los individuos pertenecientes a una misma línea, como entre individuos de líneas correspondientes a una misma mutación, y se mantiene en generaciones posteriores a la F0 (Fig. 3.1; 3.2A; 3.7; 3.12; 3.13; 3.19; 3.25; 3.26A; 3.32; 3.38A). En numerosas ocasiones se ha observado variabilidad en el nivel de expresión de transgenes. Este efecto es consecuencia no sólo del nº de loci en los que se ha insertado el transgén, sino también del entorno

genómico en el que se ubica que se conoce como efecto de posición (Koncz y col., 1989; Peach y Velten, 1991; Kohli y col., 2003). De los resultados obtenidos en individuos de una misma línea, además del efecto de posición, cabe pensar que las diferencias observadas en el contenido de los mRNAs son debidas a que las inserciones ocurrieron en múltiples loci.

En la mayoría de los casos no hemos observado una correlación directa entre los contenidos del mRNA transgénico y su proteína dentro de una misma línea, si bien las variaciones en el contenido en proteína son menos acusadas. Aunque no podemos descartar otras posibilidades, es factible que la secuencia líder (secuencia Ω de TMV) de los mRNAs usada en las construcciones, favorezca la traducibilidad de éstos al actuar como un activador de la traducción (Gallie, 2002). Así, se reducirían las diferencias observadas entre las acumulaciones de los mRNAs y sus proteínas.

El análisis funcional de los mutantes de la proteína p3a, mostró que algunos de ellos mantienen su actividad al ser capaces de restaurar los movimientos a corta y larga distancia del virus defectivo CMV-Fny Δ Kpn (mutaciones M2 y M8) o tan a corta distancia (mutación M9). En los dos primeros casos, la conservación de las mutaciones se corroboró mediante la secuenciación del mRNA, descartando la posibilidad de que hubieran ocurrido otras mutaciones compensatorias en la proteína que pudieran restaurar su actividad, como en el caso de ciertos mutantes de la proteína 30K de TMV (Deom y col., 1997; Kawakami y col., 2003). Estos resultados eran de alguna forma inesperados, puesto que las delecciones afectan al dominio central de la proteína, descrito como "indispensable" para el funcionamiento de la p3a como proteína de transporte (Li y col., 2001).

No obstante, los datos revelan que las mutaciones M2, M8 y M9 reducen la actividad de la proteína p3a, como se deduce de **i**: la menor acumulación de los RNAs defectivos virales en las plantas M2, M8 y M9 , respecto a las plantas p3a (línea 78); **ii**: del retraso en la invasión viral sistémica en las plantas M2 y en algunas plantas M8, y **iii**: la ausencia de síntomas en éstas. Estas características son típicas de un retraso en el movimiento a corta distancia como pusieron de manifiesto Sanz y col. (2000) en sus estudios de complementación del movimiento del mutante defectivo CMV-PA en estas plantas p3a (línea 78).

Si bien el patrón de acumulación viral detectado en nuestros análisis podría ser atribuido a una menor acumulación de estas proteínas mutantes en las plantas

transgénicas, el hecho de que en ningún momento se alcancen tasas de acumulación virales semejantes a las detectadas en las plantas p3a descartaría esta posibilidad. Así, nuestros datos difieren de los obtenidos en los experimentos de complementación realizados con mutantes defectivos para el movimiento de TMV y CMV en plantas que expresan sus correspondientes MPs, donde la carga viral es similar a la de los virus wt en plantas no transgénicas (Arce-Johnson y col., 1995; Kaplan y col., 1995; Sanz y col., 2000). Por otro lado, en experimentos similares, Sanz y col. (2000) habían demostrado que se necesitan unos ciertos niveles de acumulación de p3a para poder suministrar *in trans* la función de movimiento al virus defectivo CMV-PA; de forma que en plantas cuyo contenido en proteína p3a era bajo, la cantidad de RNA viral defectivo en las hojas inoculadas y sistémicas era indistinguible del de las plantas control GUS. Estos resultados, del tipo todo-o-nada en las plantas p3a, son diferentes a los obtenidos en el presente trabajo con los mutantes M2, M8 y M9.

Por tanto nuestros resultados son concordantes con una disminuida funcionalidad de las proteínas mutantes, si bien desconocemos cuál o cuáles de las funciones que ha de desempeñar la proteína p3a están afectadas.

El análisis de la localización subcelular de los mutantes reveló que todos ellos se acumulaban en la pared celular, al igual que la proteína p3a (Vaquero y col., 1994; 1996). Por tanto, ninguna de las mutaciones introducidas afecta a la señalización de esta proteína para su ubicación en la pared, indicando que las diferencias de funcionalidad encontradas no pueden ser adscritas a la pérdida en las mismas de este requerimiento. Por tanto, las proteínas pM3, pM5, y pM6 se comportarían como las proteínas de movimiento no funcionales de TMV y que también se acumulan en la pared (Kahn y col., 1998; Boyko y col., 2002). Si su disfunción estriba en la pérdida de su actividad implicada en los procesos que ocurren en la pared/plasmodesmos o en el citoplasma queda por resolver. Su dilucidación contribuirá a establecer los mecanismos que intervienen en el movimiento de CMV.

Con el fin de establecer una posible relación entre la estructura y la función de la proteína llevamos a cabo el análisis computacional de la secuencia de la proteína p3a.

La estructura secundaria de la proteína p3a obtenida mediante análisis computacional se corresponde en general con el modelo propuesto con anterioridad (Melcher, 2000), si bien difiere en la ausencia de hélices α tras el dominio β situada entre las posiciones 85-98. De esta forma en la región central de la proteína

encontramos siete elementos β que estarían flanqueados por dos hélices α , con lo que la proteína p3a tendría el modelo consenso de la superfamilia 30K (Melcher, 2000). En este modelo, las deleciones introducidas, que mostraron ser activas para el movimiento, eliminan el cuarto dominio β (mutación M2); una zona sin aparente estructura y el séptimo dominio β (mutación M8) o una zona desestructurada adyacente a la hélice α de la región C de la proteína (mutación M9).

Por otro lado, estos análisis no produjeron ningún modelo de su estructura tridimensional concluyente.

En los experimentos de fraccionamientos subcelular y observación al microscopio electrónico (Vaquero y col., 1994, 1996; Blackman y col., 1998) se había detectado que la proteína p3a, además de localizarse en la pared/plasmodesmos, se acumulaba en la fracción asociada a membranas, dependiendo del estadio de desarrollo de la planta o de fase de la infección viral. Por ello, realizamos una búsqueda informática de posibles dominios de transmembrana en esta proteína. Sin embargo, el programa utilizado no predijo ninguna región que pudiera estar involucrada en su asociación a membranas, a excepción de un posible dominio situado en la región comprendida entre los aa 160-183. El hecho de que el programa predijera en la proteína 30K de TMV la existencia –también con escasa probabilidad– de dos de estos dominios en las posiciones 61-80 y 148-170, que coinciden exactamente con el modelo propuesto por Brill y col. (2000), y dilucidado en parte experimentalmente, podría indicar la validez del análisis para la proteína p3a. La no funcionalidad *in trans* de las mutaciones M5 (aa Δ 164-173) y M6 (aa Δ 174-183) sería concordante con este análisis.

La utilización de los mutantes pM5 y pM6 en futuros ensayos bioquímicos e histoquímicos podrían ser de enorme utilidad para dilucidar esta cuestión. De esta forma, determinaríamos si la proteína p3a podría ser considerada como una proteína integral de membrana y si su unión (Vaquero y col., 1994, 1996; Kaplan, 1995) es similar a la propuesta para la proteína 30K de TMV (Brill y col., 2000) y p9 del carmovirus del moteado del clavel (Vilar y col., 2002). El modelo contempla que ambas MP se insertarían en la membrana del RE a través de dos regiones hélice α , dejando los extremos N y C expuestos hacia el citoplasma; en la región C de la proteína 30K se produciría la interacción con el RNA, mientras que la proteína p9 de CarMV interaccionaría con la proteína p7, que es la responsable de unión al ácido nucleico (Vilar y col., 2001). De forma similar, la región de la proteína p3a posiblemente involucrada en la unión a ácidos nucleicos (aa 174-233, Vaquero y col., 1997) y

necesaria para el requerimiento de la CP (últimos 33 aa, Nagano y col., 2001) quedarían expuestas en el citoplasma.

La inactividad de la mutación M3 (aa Δ 144-153) coincide con la pérdida de la función para el movimiento del mutante M5, descrito por Ding y col. (1995) y Li y col., (2000), en el que los aa Y144 y D145 fueron sustituidos por Ala. Este mutante es incapaz de translocarse a sí mismo o al RNA viral y de incrementar el SEL de los plasmodesmos, y no es funcional cuando se expresa *in cis* con el resto del genoma. Además en la región delecionada se ubica una de las cuatro Met de la proteína p3a, aa esencial en interacciones proteína-proteína (Jones y Thornton, 1996), lo que apunta a la relevancia funcional de este dominio en p3a.

La funcionalidad de las otras tres mutaciones M2, M8 y M9 indica que estos dominios son prescindibles en la proteína. En este sentido cabe resaltar que en ninguna de las tres regiones eliminadas (aa 134-143, 193-203 y 204-213) se sitúan los posibles lugares de modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación o glicosilación, y que pudieran estar implicadas en la actividad de la proteína. Tampoco se sitúan en la región hidrofóbica ubicada entre los aa 86 y 118, está conservada en todos los miembros de la superfamilia 30K (Melcher y col., 2000) y que pudieran estar involucradas en la interacción con membranas.

En estudios anteriores donde se utilizan proteínas p3a en las que se habían delecionado regiones amplias, Kaplan y col (1995) demostraron que la zona comprendida entre los aa 209 y 236 era requerida para la actividad de la proteína. A su vez, esta región solapa con la región identificada por Vaquero y col., (1997) , situada entre los aa 174-233, que tiene capacidad de unión a RNA. En la zona común entre ambas construcciones, el modelo de estructura secundaria de la proteína predice que el dominio comprendido por los aa 215 y 226 puede adoptar una conformación de hélice α (Fig.3.44). Si bien no podemos descartar que otras zonas pudieran participar en esta unión, los datos serían concordantes con que la región involucrada en la interacción con el RNA podría corresponder a la región hélice α , conformación requerida para la unión a RNA de otras proteínas de movimiento y de cubierta virales (Vilar y col., 2001; Aparicio y col., 2003). Además, esta región contiene un grupo de aa con capacidad potencial para unir a ácidos nucleicos (Vaquero y col., 1997). Por otro lado, Kragler y col. (2000) proponen, en base a la homología de secuencias de péptidos que interfieren con el transporte de la proteína p3a en experimentos de microinyección, que en esta región (aa 222-248, dominios 222-234;

236-248) se situaría un dominio de unión a la maquinaria de transporte a través de los plasmodesmos. Independientemente de la(s) funcione(s) en las que esté implicada la hélice α , nuestros datos ponen de manifiesto que la eliminación de los aa 192-203 (M8) o 204-212 (M9) fuera de este dominio estructural son prescindibles para el movimiento viral, lo que indicaría que los dominios deleccionados no están involucrados en esta(s) interacción(es); o que las alteraciones estructurales introducidas no le afectan.

No obstante, conviene resaltar que de los tres mutantes funcionales descritos en el presente trabajo, la delección de la zona contigua a la hélice α (M9) fue la que incidió más negativamente en la actividad de la proteína. De hecho, no es capaz de rescatar el movimiento a larga distancia del mutante defectivo y su eficacia en el de corta distancia es muy limitada, según se deduce de las bajas acumulaciones de los RNAs virales defectivos en las hojas inoculadas. Aunque, como mencionábamos anteriormente, desconocemos las actividades requeridas para el movimiento que se encuentran afectadas en este mutante, es posible que esta delección disminuya la capacidad de unión a ácidos nucleicos y/o a membranas/plasmodesmos. Esto conllevaría a una restricción del movimiento local y consecuentemente podría limitar la invasión sistémica del huésped.

Otro objetivo del trabajo consistía en evaluar si la expresión constitutiva de mutantes de delección de la proteína p3a podría conferir protección a la infección por el virus homólogo.

Para los ensayos de protección, escogimos como dosis de inóculo, las mínimas dosis de virus que permitieran la infección del 100% de las plantas control, y que fue determinado empíricamente. Si bien estas dosis son muy elevadas y obviamente no reproducen las condiciones de campo, nos asegurarían que en caso de existir resistencia ésta fuera eficaz. Asimismo, en la mayoría de los ensayos mostrados, utilizamos como inóculo un mismo lote de virus, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en los experimentos diferentes que se llevaron a cabo con las plantas que expresaban los distintos mutantes de p3a.

En el análisis de la acumulación viral por ELISA y del desarrollo de los síntomas en las plantas de generación F0 observamos comportamientos heterogéneos entre plantas de una misma línea y entre las diferentes líneas correspondientes a la misma mutación. No obstante, la mayoría de las líneas ensayadas, en mayor o menor grado, fueron susceptibles a la infección viral. En el análisis de plantas de generaciones

posteriores, F1 y F2, encontramos un comportamiento más homogéneo entre las líneas de individuos correspondientes a la misma mutación y además, nos permitió establecer semejanzas entre líneas pertenecientes a mutaciones diferentes. Así, mientras que en todas y/o algunas líneas de plantas M2 y M8 calculamos cargas virales en las hi y/o hs superiores a los determinados en las plantas control GUS (Fig. 3.4; 3.5; 3.30), en las de algunas líneas M3, M5, M6 y M9 fueron inferiores (Fig. 3.11; 3.17; 3.23; 3.36) y en las hs de un porcentaje muy elevado de plantas M10 no detectamos el virus (Fig. 3.41). Estos datos indican que la expresión de algunos transgenes virales de la p3a interfieren con el proceso de infección viral. Aunque podemos descartar que esta interferencia sea mediante RNA y/o RNA y proteína, las diferencias encontradas entre las diversas construcciones, así como la correlación entre el contenido de proteína pM3 y grado de protección (aptdo. 3.2.3) involucran a las proteínas en los distintos comportamientos.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que la expresión constitutiva de las proteínas **i**: pM2 y pM8 favorece el proceso de infección viral; **ii**: pM3, pM5, pM6 y pM9 interfiere en la expansión del virus en las hojas inoculadas y, a su vez, en las tres últimas, este efecto también se manifiesta en las hojas sistémicas. Finalmente, la expresión del transgén M10 y/o del péptido M10 lleva consigo exclusivamente la inhibición del movimiento sistémico.

El aumento transitorio en el contenido viral de las hi y hs de las plantas M2 y M8, respecto a las plantas control, así como la presencia en las hi de focos de infección en nº e intensidad superior al detectado en las plantas GUS, indican que este efecto tiene lugar en los estadios iniciales de la infección. En el caso de las plantas de las líneas M2 pertenecientes a la generación F2, el incremento viral se correlaciona con los niveles de expresión de la proteína pM2. Así, en las plantas M2.1.3.2, donde la acumulación de dicha proteína es mayor que en las plantas M2.66.1.7 (Fig. 3.5), encontramos concentraciones virales a los 7 d.p.i. hasta 1,5 (en hi) y 2,2 (en hs) veces superiores a las determinadas en las últimas. Sin embargo, con los datos disponibles no podemos establecer esta misma relación en las plantas M8.

No podemos descartar que estos datos reflejen una replicación favorecida del virus homólogo, pero el hecho de que el incremento observado sea transitorio, indica que la proteína p3a no afecta a los procesos de replicación (Boccard y Baulcombe, 1993) y que su expresión constitutiva no conduce a un incremento de carga viral en los protoplastos de las plantas p3a (línea 78), aunque tenga efectos similares sobre la

acumulación viral desecharían esta posibilidad (M. A. Guevara, comunicación personal).

El aumento transitorio podría deberse, por tanto, a la participación de sus correspondientes proteínas en los procesos de movimiento. Incrementos en la acumulación de virus en las hojas inoculadas como consecuencia del movimiento se ha observado en plantas de *N. benthamiana* que expresan constitutivamente MPs funcionales de TMV o RCNMV inoculadas con el virus de insectos FHV (virus de la cabaña). En general, la expresión constitutiva en las plantas de MP funcionales incrementa la susceptibilidad a virus homólogos, e incluso heterólogos, ya sea aumentando transitoriamente la carga viral, adelantando la formación de síntomas o incluso intensificándolos (Arce-Johnson y col., 1995; Ares y col., 1998; Cooper y col., 1995; Sanz y col., 2002), como ocurre en los individuos M2 de la generación F2 que desarrollan síntomas de mayor intensidad que los de las plantas control.

Por otro lado, la mayor susceptibilidad a la infección viral descrita para las plantas que expresan MPs funcionales de CMV (Kaplan y col., 1995; Cooper y col., 1996; Sanz y col., 2000, este trabajo) no puede atribuirse a graves alteraciones fisiológicas en la planta, puesto que fenotípicamente son indistinguibles de las plantas control (GUS) o no transgénicas, a diferencia de lo que ocurre en las plantas que expresan la MP de TMV o AIMV. Éstas tienen un porte distinto al de las plantas control, reflejo de modificaciones, al menos, del metabolismo del C. Estos cambios podrían por ser responsables de la mayor susceptibilidad a la infección (Rothfrisch y col., 1996; Lucas y Wolf, 1999).

Finalmente, no podemos descartar que el incremento transitorio de carga viral en las plantas M2 y M8 sea debido a su función como elementos de patogenicidad viral, y que su interacción con factores del huésped involucrados en mecanismos de defensa/vigilancia conlleve a la supresión de respuestas de defensa del huésped.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que la expresión constitutiva de las proteínas pM3, pM5, pM6 y pM9 en plantas de tabaco de la generación F1, producen una caída en la acumulación viral, y limitan la invasión del tejido sistémico, a la vez que atenúan o inhiben la formación de síntomas. Así, en las plantas de 4/7 líneas M3, las tasas de acumulación viral detectadas en las hi a los 7 y 14 d.p.i. son inferiores a las determinadas en las plantas GUS, efecto que se mantiene en tres de ellas en las hs a los 14 d.p.i.. Esta inhibición es más acusada en las hi de las plantas M3.55.5 a los 7 d.p.i., donde la acumulación viral llega a ser 4,32 veces inferior a la control (Fig. 3.11). En las

plantas M9 encontramos un comportamiento similar al de las plantas M3, ya que en las hi de las 2 líneas ensayadas la carga viral fue inferior a la control a los 7 d.p.i. y este efecto se mantenía a los 14 d.p.i. Además, este retraso inicial se manifestaba también a nivel sistémico ya que en algunas plantas (37,5%-25%) de una las líneas no detectamos virus (Fig. 3.36). De forma similar, en las plantas de 7/10 líneas M5 observamos una interferencia en la expansión local al primer tiempo analizado, provocando una caída en las tasas de acumulación virales de hasta el 50% con respecto a los controles. Además, al igual que en las plantas M9, este efecto inicial se ve reflejado a nivel sistémico en un porcentaje variable de plantas donde no detectamos el virus (hasta en el 50% de las plantas M5.68.8). A diferencia de lo que ocurría en las plantas M3 y M9, el retraso en la invasión local no se mantiene a los 14 d.p.i. (Fig. 3.17). En las plantas de 3/5 líneas M6 ensayadas, como en las plantas M3, M5 y M9, encontramos una interferencia en el movimiento local, que se manifestaba sistémicamente en 2 de ellas. Además, como ocurría en las plantas M5, este efecto no se mantenía en las hi a los 14 d.p.i. (Fig. 3.23).

En este sentido, Lapidot y col. (1993) mostraron resultados similares donde existían diferentes grados de resistencia a TMV en diferentes líneas que expresaban la misma proteína de movimiento defectiva.

Además observamos que el nº, intensidad y expansión de los focos de infección en las improntas de las hi de estas plantas son inferiores a los de las plantas control, indicando que los procesos iniciales de la infección: replicación y/o movimiento viral deben encontrarse afectados. En base a lo anteriormente citado, es de esperar que en estas plantas estén afectados los procesos de movimiento y no los de replicación. En cualquier caso, los resultados ponen de manifiesto la importancia de estos procesos iniciales de la infección en el desarrollo de los síntomas (ref. en Sanz y col., 2000).

La ausencia de funcionalidad de las proteínas pM3, pM5 y pM6 detectada en los experimentos de complementación se correlacionaría con una interferencia ejercida por estos mutantes defectivos con la proteína p3a. De esta forma estas proteínas se comportarían como mutantes defectivos dominantes que protegen a la planta de la infección, tal y como ha sido descrito para el mutante de la MP de TMV cuya expresión en las plantas produce una reducción del tamaño de las LLN y un retraso en la acumulación viral y en la manifestación de los síntomas (Lapidot y col., 1993).

El hecho de que también detectemos protección en plantas M9, capaces a su vez de complementar el movimiento célula a célula de un virus mutante defectivo en principio era inesperado. Sin embargo existen datos en la literatura que muestran que mutantes de MPs de CMV, con una actividad reducida, pueden interferir con la proteína p3a. Así en los experimentos de coinoculación de los RNAs 1 y 2 de CMV con RNA 3 wt y un RNA 3 que codifica una proteínas p3a parcialmente funcional se observó una notable reducción del movimiento viral (Nagano y col., 2001). Asimismo, la inoculación de plantas p3a con transcritos de CMV-Fny cuya MP contenía las posiciones aa N191-Y192 sustituidas por Ala no se acumulaba en las plantas y cuando se coinoculaba con CMV-Fny RNA 3 –en experimentos similares a los anteriores– interfería con la acumulación viral (Li y col., 2001). Estos datos concuerdan con el hecho de que la proteína M9 tenga una funcionalidad reducida y a su vez interfiera con el movimiento viral.

Canto y Palukaitis (1998) demuestran que la expresión constitutiva del RNA 1 de CMV-Fny es capaz de complementar la replicación y el movimiento de los RNAs 2 y 3 de CMV, pero a su vez inhibe la invasión sistémica. Además detectan una inhibición específica de la acumulación de RNA 1, lo cual implicaría la existencia de mecanismos de defensa a través de RNA o de la proteína. Si bien estos datos guardan similitud con los resultados obtenidos en los experimentos de complementación y protección mediada por las plantas M9; a diferencia de los resultados obtenidos con las plantas que expresan el RNA 1 de CMV, no observamos caídas en la acumulación del RNA 3 (Fig. 3.33) lo cual indicaría que la protección mediada por la proteína M9 es distinta de la mediada por el RNA 1. Diferencias en la funcionalidad de ambas proteínas pueden ser responsables de las diferencias encontradas.

En este sentido, cuando las proteínas truncadas ocupan las dianas/ los sitios de unión en la célula, éstos son inaccesibles a la p3a producida por el virus desafiante. Consiguientemente, el virus se mantiene dentro de las células inicialmente infectadas. El hecho de que estas proteínas reduzcan pero no eliminen la expansión viral puede ser el resultado de una interferencia completa debido a los niveles de expresión del gen, o a una incompleta competición entre las proteínas truncadas con la p3a salvaje por sus lugares dentro de la célula, ya sea en el citoplasma o en la pared/plasmodesmos.

De esta forma, la expresión transgénica de las proteínas pM3, pM5, pM6 y pM9 en plantas de tabaco reduce, pero no elimina completamente, el movimiento de CMV-24 desde las células inicialmente infectadas a las células adyacentes.

Germundsson y col., 2002, frente a Reavy (1995), utilizando plantas resistentes a PMTV transgénicas de *N. benthamiana* transformadas con la CP en un caso describen un 98% de plantas en las que no se detecta virus, frente a 30% de datos llevados a cabo en otros laboratorios o de patata 7% de plantas de patata infectadas frente al 20% de los controles; o un 0% frente al 10%.

No obstante es posible que en condiciones de campo, su comportamiento frente a la infección viral sea más operativa. La mayor diferencia en el caso de los virus que se transmiten por áfidos es que están sometidos a sucesivas inoculaciones pero a unas dosis muy bajas de virus, que obviamente no podemos reproducir en las cámaras que poseemos en nuestro laboratorio. Así por ej. plantas de patata resistentes a PMTV son resistentes en el campo pero no en laboratorio; y su comportamiento depende de la dosis de inóculo o de la vía de inoculación.

Finalmente en las plantas M10 detectamos un efecto protector en las tres líneas analizadas, correspondientes a la generación F1, que incide sobre la invasión sistémica. Así, en las hojas inoculadas no observamos diferencias en la carga viral ni en el nº, intensidad y expansión de los focos de infección respecto a las plantas control (Fig. 3.41 y 3.42). Por el contrario, en las hs de un elevado porcentaje de plantas M10 - que oscilaba entre el 50 y el 85% a los 7 d.p.i., y entre el 12,5 y el 50% a los 14 d.p.i.- no detectamos virus mientras que sí lo hallamos en el 100% de las plantas control. Datos que fueron corroborados en improntas de tejido. La ausencia de virus en los peciolo de las hojas inoculadas unido a una acumulación similar o incluso superior de virus en la hi coincide con que esta resistencia funciona en la entrada a o dentro del sistema vascular, y no con los procesos de movimiento célula a célula y/o replicación.

Esta protección difiere por tanto de otras operativas frente a CMV, ya sean mediadas por la expresión de secuencias derivadas del RNA 1 (Canto y Palukaitis, 1998, 2001), del RNA 2 (Wintermantel y col., 1997) o de la CP (ref. en Jacquemond y col., 2001). Todas ellas y a excepción de la protección tardía mediada por la CP, que comentaremos más adelante, actúan a nivel celular, y se traducen en una menor acumulación viral en la hoja inoculada, mientras que en las plantas M10 no detectamos tales diferencias. Es por ello posible pensar que en estas plantas, la

protección se ejerce en el proceso del movimiento a larga distancia viral. Si esta interferencia es ejercida por un mecanismo dependiente del RNA o de la proteína transgénica es actualmente desconocido. La detección de los RNAs M10 antes de que las plantas sean inoculadas, y de la CP viral en las hi en cantidades similares a las de las plantas control indican que estas plantas no estaban suprimidas antes de ser inoculadas, si bien sería posible que tras el establecimiento de la infección se activara el mecanismo de VIGS y que impidiera la invasión sistémica de las plantas. Sin embargo, el patrón de protección observado en las plantas M10 es claramente diferente de la resistencia típica resultante de dicha activación. Generalmente, la activación de VIGS se expresa en las hojas jóvenes –en proceso de desarrollo durante el momento de la infección- y conlleva i: una fase inicial de la infección sistémica, en la que no se observan diferencias con las plantas control, en cuanto a la acumulación viral y los síntomas, seguida de ii: un proceso de recuperación en las hojas superiores, y que estaban en proceso de desarrollo en el momento de la infección, y que puede ir acompañada o no de la supresión del transgen, dependiendo de dónde actúe el supresor viral (Baulcombe, 2002; Mlotshwa y col., 2002). Este fenotipo de resistencia ha sido observado por Jacquemond y col. (2001) en plantas de tabaco transformadas con la CP de CMV-R, en las que los síntomas y la acumulación viral desaparecían en las hojas jóvenes a tiempos tempranos, o tras varias semanas p.i., dependiendo del experimento y/o de la generación de plantas analizadas, y como mencionábamos anteriormente difiere del fenotipo de protección de las plantas M10.

En 2001, Canto y Palukaitis formulan la hipótesis de que la resistencia conferida por la expresión de los RNAs 1 y 2 pudieran desencadenar el mecanismo de PTGS localmente en los tejidos conductores, donde la expresión del promotor 35S es más acusada. Esta posibilidad podría explicar la inhibición del movimiento sistémico viral en plantas M10, que a su vez podría ser suprimido posteriormente en el transcurso de la infección.

Alternativamente, la interferencia podría ser ejercida por el péptido M10. Si bien carecemos de datos que demuestren que está mediada por dicho péptido, cabría la posibilidad de que su expresión constitutiva pudiera interferir con alguno de los procesos en los que está involucrada la proteína p3a, tales como el movimiento y posiblemente en la encapsidación del virus en el tejido conductor (Blackman y col., 1998). La funcionalidad de esta región en la proteína p3a, en actividades virales y/o en la interacción con el huésped, fue puesta de manifiesto por Canto y Palukaitis (1999a;

b) y Li y col. (2000) al determinar que la sustitución D20A y D21A conllevaba a la inhibición del movimiento de la proteína a otras células epidérmicas, ni a la inducción de NLL en *C. quinoa* y *V. unguiculata*. Además, Kragler y col (2001) proponen la existencia de un posible dominio de unión a membranas –contenido en este péptido, entre los aa 20-31- con el que interferirían péptidos antagonistas del ensanchamiento de los plasmodesmos. Por tanto, la acumulación del péptido en la pared de los vasos cribosos podría interferir con los lugares de acumulación preferencial de la proteína p3a, y que ha sido postulado como el lugar de encapsidación antes de que el virus pase al floema para su traslocación (Blackman y col., 1998). El hecho de que estos lugares estén asociados a membranas y que este péptido contenga uno de estos dominios- sería coincidente con la interferencia ejercida por pM10. La utilidad de la expresión constitutiva de péptidos en plantas, como un sistema de control de las enfermedades virales, ha sido demostrado recientemente por Rudolph y col. (2003) al determinar que la expresión de un péptido de 29 aa que interacciona con la proteína de la nucleocápsida de TSWV, ejerce una fuerte interferencia con la infección de diferentes tospovirus en plantas de *N. benthamiana*.

Finalmente, no podemos descartar la posibilidad de que en esta protección puedan intervenir algún tipo de resistencia conferida por la planta, y que resulte de la expresión del gen o proteína M10. Aunque las plantas eran fenotípicamente indistinguibles de las plantas control, transgénicas o no transgénicas, el hecho de que el dominio altere el patrón de infección en huéspedes resistentes (Lin y col., 2001) podría ser indicativo de que este dominio pudiera corresponder a una zona potencialmente activa en la patogénesis viral y en la interacción con el huésped. Consiguientemente, su expresión constitutiva podría activar mecanismos de defensa, comportándose de esta forma como una molécula implicada en la inducción de respuestas de la planta (Bisseling, 1999).

Por tanto el conjunto de estos resultados, además de proporcionar valiosos instrumentos para profundizar en el conocimiento de la relación entre la estructura y función de la proteína p3a de CMV, y consiguientemente en el proceso del transporte de los virus de plantas, muestran que la expresión de ciertas formas mutadas de la proteína p3a en plantas de tabaco previenen a las plantas de la infección con el virus homólogo, expandiendo previos estudios de que las MPs pueden interferir con la invasión viral.

5.- CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones pueden inferirse de los resultados presentados:

1.- La no detección de la hipotética proteína codificada por el transgén M10 es debida a que en el nt correspondiente a la posición 238 del RNA 3 de CMV 24 se había producido una sustitución de G por A, dando lugar a la aparición de un codon de terminación (UGA) que originaría una proteína truncada de 46 aa; no detectable en nuestros ensayos.

2.- Los dominios de la proteína p3a comprendidos entre los aa134-143; 193-203 y 204-213 no se requieren para el movimiento de célula a célula viral. Los dos primeros tampoco lo son para la infección sistémica del huésped.

3.- Los dominios ubicados entre los aa 144-153 y 164-183 son necesarios para la actividad in trans de la proteína.

4.- La expresión constitutiva en las plantas de tabaco de los dos mutantes de la proteína p3a competentes para los dos tipos de movimiento incrementa la susceptibilidad a la infección del virus homólogo.

5.- La expresión constitutiva de los otros mutantes protege a las plantas frente a la infección del virus homólogo. El modo y grado de protección depende del transgen expresado.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Aaziz, R., Dinant, S., and Epel, B.L. 2001. Plasmodesmata and plant cytoskeleton. **Trends Plant Sci.** **6**, 326-330.
- Alzhanova, D. V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V. V. and Dolja, V. V. 2000. Genetic Analysis of the Cell-to-Cell Movement of Beet Yellows Closterovirus. **Virology** **268**, 192-200.
- Alzhanova, D. V., Napuli, A. J., Creamer, R., and Dolja, V. V. 2001. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. **EMBO J.** **20**, 6997-7007.
- Anderson, J.M., Palukaitis, P., and Zaitlin, M. 1992. A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**, 8759-8736.
- Aparicio, F., Vilar, M., Perez-Paya, E., and Pallas, V. 2003. The coat protein of prunus necrotic ringspot virus specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. **Virology** **313**, 213-23.
- Arce-Johnson, P., Kahn, T., Reimann-Philipp, U., Rivera-Bustamente, R., and Beachy, R. 1995. The amount of movement protein produced in transgenic plants influences the establishment, local movement, and systemic spread of infection by movement protein-deficient tobacco mosaic virus. **Mol. Plant Microbe. Interact.** **8**, 415-423.
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R. N., and Mentaberry, A., 1998. Transgenic Plants Expressing Potato Virus X ORF2 Protein (p24) Are Resistant to Tobacco Mosaic Virus and Ob Tobamoviruses. **J. Virol.** **72**, 731-738.
- Bartel B., and Bartel D. P. 2003. MicroRNAs: at the root of plant development. **Plant Phisyol.** **132**, 709-717.
- Baughman G., and Howell, S.H. 1988. Cauliflower mosaic virus 35S RNA leader region inhibits translation of downstream genes. **Virology** **167**, 125-135.
- Baulcombe, D. C. 1994. Novel strategies for engineering virus resistance in plant. **Curr. Op. Biotechnol.** **5**, 117-124.
- Baulcombe, D. C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **Plant Cell** **8**, 1833-1844.
- Baulcombe, D. C. 1999. Virus and gene silencing in plants. **Arch. Virol (Suppl)** **15**, 189-201.
- Baulcombe, D. C. 2002. RNA silencing. **Curr. Biol.** **12**, R82-R84.
- Beachy, R. N. 1997. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Curr. Opin. Biotechnol.** **8**, 215-220.
- Beachy, R. N., and Heinlein, M. 2000. Role of P30 in replication and spread of TMV. **Traffic** **1**, 540-544.
- Beck, D. L., Van Dolleweerd, C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M., Andersen, M. T., O'Brien I. E., and Foster, R. L. 1994. Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**, 10310-10314.

Bendahmane, M., and Beachy, R. N. 1999. Control of tobamovirus infections via pathogen-derived resistance. **Adv Virus Res.** **53**, 369-386.

Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. **Plant Cell** **11**, 781-791.

Bendahmane, M., Szecsi, L., Chen, I., Berg, R. H., and Beachy, R. N. 2002. Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **99**, 3645-3650.

Billeter, M., Guntert, P., Lugjubuhl, P., and Wuthrich, K. 1996. Hydration and DNA recognition by homeodomains. 1996. **Cell** **85**, 1057-1065.

Blackman, L. M., Boevink, P., Santa Cruz, S., Palukaitis, P., and Oparka K. J. 1998. The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. **Plant Cell** **10**, 525-537.

Blanchard, C. L., Boyce, P., and Anderson, B. J. 1996. Cucumber mosaic virus RNA5 is a mixed population derived from the conserved 3' terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. **Virology** **217**, 598-601.

Blanchard, C. L., Higgins, T. J., and Anderson, B. J. 1997. RNAs 4A y 5 are present in tomato aspermy virus and both subgroups of cucumber mosaic virus. **Arch. Virol.** **142**, 1273-1283.

Boccard, F., and Baulcombe D. C. 1993. Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA 3 of Cucumber mosaic virus. **Virology** **193**, 563-578.

Bowman, V. D, Chase, E. S, Franz, A. W., Chipman, P. R., Zhang, X., Perry, K. L., Baker, T. S., and Smith, T. J. 2002. An antibody to the putative aphid recognition site on cucumber mosaic virus recognizes pentons but not hexons. **J Virol.** **76**, 12250-12258.

Boyko, V., Ashby, J. A., Suslova, E., Ferralli, J., Sterthaus, O., Deom, C. M., and Heinlein, M. 2002. Intramolecular complementing mutations in tobacco mosaic virus movement protein confirm a role for microtubule association in viral RNA transport. **J. Virol.** **76**, 3974-3980.

Brededore, F. T., Taschner, P. E. M., Posthumus, E., and Bol, J. F. 1995. Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. **Virology** **207**, 467-474.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO J.** **17**, 6739-6746.

Brommonschenkel, S. H, Frary, A., Frary, A., and Tanksley, S. D. 2000. The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. **Mol. Plant Microbe Interact.** **13**, 1130-1138.

Bucher, G. L, Tarina, C., Heinlein, M., Di Serio, F., Meins, F. Jr., and Iglesias, V. A. 2001. Local expression of enzymatically active class I beta-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **Plant J.** **28**, 361-369.

Bucher, E., Sijen, T., De Haan, P., Goldbach, R., and Prins, M.. 2003. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **J Virol.** **77**, 1329-1336.

Buck, K. W. 1996. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. **Adv. Virus. Res.** **47**, 159-251.

Canto, T., and Palukaitis, P. 1998. Transgenically expressed cucumber mosaic virus RNA 1 simultaneously complements replication of cucumber mosaic virus RNA 2 y 3 and confers resistance to systemic infection. **Virology** **250**, 325-336.

Canto, T., and Palukaitis, P. 1999a. Replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus does not inhibit localization and/or trafficking of the viral movement protein. **Mol. Plant Microbe Interac.** **12**, 743-747.

Canto, T., and Palukaitis, P. 1999b. The hypersensitive response to cucumber mosaic virus in *Chenopodium amaranticolor* requires virus movement outside the initially infected cell. **Virology** **265**, 74-82.

Canto, T., and Palukaitis, P. 2001. A CMV RNA1 transgen mediates suppression of the homologous viral RNA1 constitutively and prevents CMV entry into the phloem. **J. Virol** **75**, 9114-9120.

Canto, T., Prior, D. A. M., Hellwald, K. H., Oparka, K. J., and Palukaitis, P. 1997. Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of CMV. **Virology** **237**, 237-248

Carr, J. P., Marsh, L. E., Lomonossoff, G. P., Sekiya, M. E., and Zaitlin, M. 1992. Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54 KDa gene sequence requires expression of the 54 KDa protein. **Mol. Plant Microbe Interact.** **5**, 397-404.

Carr, J. P., Gal-On, A., Palukaitis, P., and Zaitlin M. 1994. Replicasa mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement. **Virology** **199**, 439-47.

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., and Schaad, M. C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell** **8**, 1669-1681

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., and Johansen, L. K. 2001. Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. **Virology** **281**, 1-5

Chen, J., and Ahlquist, P. 2001. Brome mosaic virus protein 1a recruits viral RNA2 to RNA replication through a 5' proximal RNA2 signal. **J. Virol.** **75**, 3207-3219.

Chen, M. H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A. K., and Citovsky, V. 2000. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. **EMBO J.** **19**, 913-920.

Chen, M .H., Roossink, M. J., and Kao, C. 2000. Efficient and specific initiation of subgenomic RNA synthesis by cucumber mosaic virus replicase in vitro requires an upstream RNA stem-loop. **J. Virol** **74**, 11201-11209.

Chen, J., Noueiry, A., and Ahlquist, P. 2003. An alternate pathway for recruiting template RNA to the brome mosaic virus RNA replication complex. **J. Virol.** **77**, 2568-2577.

Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. 2000. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 489-494.

Cillo, F., Roberts I. M., and Palukaitis, P., 2002. In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber. **J. Virol.** **76**, 10654-10664.

Collmer and Howell, 1992. *Ann Rev. Phytopathol.* **30**: 419

Cooley, M. B., Pathirana, S., Wu, H. J., Kachroo, P., Klessig, D.F. 2000. Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. **Plant Cell** **12**, 663-676.

Cooper, B., and Dodds J. A. 1995. Differences in the subcellular localization of tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus movement proteins in infected and transgenic plants. **J. Gen. Virol** **76**, 3217-3221

Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A., and Beachy, R. N. 1995. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. **Virology** **206**, 307-13.

Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A. L., Beachy, R. N., and Dodds, J. A. 1996. Cell-to-cell transport of movement-defective cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in transgenic plants expressing heterologous movement protein genes. **Virology** **216**, 208-213.

Cuozzo, M., O'Connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R. X., Chua, N. H., and Tumer, N. E. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. **Bio/Technology** **6**, 549-557.

Dawson, W. O., and Hilf, M. E. 1992. Host-range determinants of plant viruses. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **43**, 527-555.

De Jong, W., Mise, K., Chu, A., and Ahlquist, P. 1997. Effects of coat protein mutations and reduced movement protein expression on infection spread by cowpea chlorotic mottle virus and its hybrid derivatives. **Virology** **26**, 167-173.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Mol. Biol. Rep.** **1**, 19-21.

Deom, C. M., Quan, S., and He, X. Z. 1997. Replicase proteins as determinants of phloem-dependent long-distance movement of tobamoviruses in tobacco. **Protoplasma** **199**, 1-8.

Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M. H., Park, J. W., and Scholthof HB. 2002. A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. **Plant Physiol.** **129**, 1521-1532.

Díaz-Ruiz, J. R., Ávila-Rincón, M. J., and García-Luque, I. 1987. Subcellular localization of cucumoviruses-associated satellite double-stranded RNAs. **Plant Sci.** **50**, 239-248.

Dinant, S., Janda, M., Kroner, P. A., and Ahlquist, P. 1993. Bromovirus RNA replication and transcription require compatibility between the polymerase- and helicase-like viral RNA synthesis proteins. **J. Virol.** **67**, 7181-7189.

Ding, B. 1996. Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. **Plant J.** **10**, 157-164.

- Ding, B. 1998. Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. **Plant Mol. Biol.** **38**, 279-310.
- Ding, S. W., Anderson, B. J., Haase, H. R., and Symons, R. H. 1994. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. **Virology** **198**, 593-601.
- Ding, S. W., Li, W. X., and Symons, R. H. 1995a. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movements. **EMBO J.** **14**, 5762-5772.
- Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P., and Lucas, W. J. 1995b. Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell movement of tobamoviruses in tobacco. **Protoplasma** **199**, 1-8.
- Ding, S. W., Shi, B. J., Li, W. X., and Symons, R. H. 1996. An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**, 7470-7474.
- Dorokhov, Y. L., Makinen, K., Frolova, O. Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Alabekov, J. G., and Saarma, M. 1999. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. **FEBS Lett** **461**, 223-228.
- Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** **1**, 316-323.
- Dugeon, G., and Jupin, I. 2002. Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. **J Gen Virol** **83**, 3187-3197.
- Duan, Y. P., Powell, C. A., Webb, S. E., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. 1997. Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing BC1 protein. **Mol. Plant Microbe Interact.** **10**, 617-623.
- Dunoyer, P., Ritzenthaler, C., Hemmer, O., Milcher, P., and Fritsch, C. 2002. Intracellular localization of the peanut clump virus replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein labelled endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. **J. Virol.** **76**, 865-874.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. 2002. The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. **Plant J.** **32**, 927-934.
- Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1991. Cucumoviruses. p.293-319 In Edwardson, J. R., and Christie, R. G (ed.), CRC handbook of viruses infecting legumes. J. R. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla
- Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T. 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Curr Opin Plant Biol.** **3**, 278-284.
- Escobar, N. M, Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S., and Oparka, K. 2003. High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. **Plant Cell.** **15**, 1507-23.
- Fitchen, J. H., and Beachy, R. N. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. **Annu. Rev. Microbiol.** **43**, 739-763.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Ann. Rev. Phytopathol.** **9**, 275-296.
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., and Angell, S. 2003. TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. **Mol Plant Microbe Interact.** **16**, 132-140.

Gabriel, d. W., and Rolfe, B. G. 1990. Working models of specific recognition in plant microbe interactions. **Ann. Rev. Phytopathol.** **28**, 365-391.

Gal-On, A., Kaplan, I., Roossinck, M. J., and Palukaitis, P. 1994. The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicates a function for RNA 1 in virus movement. **Virology** **205**, 280-289.

Gal-On, A., Kaplan, I., and Palukaitis, P. 1996. Characterization of Cucumber mosaic virus. II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. **Virology** **226**, 354-361.

Gallie, D. R. 2002. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. **Nucleic Acids Res.**, **30**, 3401- 3411.

Gallitelli, D. 2000. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. **Virus Res.** **71**, 9-21.

García-Luque, I., Kaper, J. M., Díaz-Ruiz, J. M., and Rubio-Huertos, M. 1983. Cucumovirus survey in Spanish economically important crops. **Phytopatologia Mediterranea** **22**, 127-132.

García-Luque, I., Kaper, J. M., Díaz-Ruiz, J. R., and Rubio-Huertos, M. 1984. Emergence and characterization of satellite RNA 5 associated with spanish cucumber mosaic virus isolates. **J. Gen. Virol.** **65**, 539-547.

Gerlach, W. L., Llewellyn, D., and Haseloff, J. 1987. Construction of a plant disease resistance gene using satellite RNA of tobacco ringspot virus. **Nature** **328**, 802-805.

Germundsson, A., Sandgren, M., Barker, H., Savenkov, E. I., and Valkonen, J. P. T. 2002. Initial infection of roots and leaves reveals different resistance phenotypes associated with coat protein gene-mediated resistance to Potato mop-top virus. **J Gen Virol** **83**, 1201–1209.

Ghoshroy, S., Lartey, R., Sheng, J., and Citovsky, V. 1997. Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **48**: 27-50.

Gilbertson, R. L., and Lucas, W. J. 1996. How the viruses traffics on the vascular highway?. **Trends Plant Sci.** **1**, 260-267.

Gillespie, T., Boevink, P., Haupt, S., Roberts, A. G., Toth, R., Valentine, T., Chapman, S., and Oparka, K. J. 2002. Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. **Plant Cell.** **14**, 1207-1222.

Goldbach, R., Bucher, E., and Prins, M. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. **Virus Res.** **92**, 207-212.

Golemboski, D. B., Lomonossoff, G. P., and Zaitlin, M. 1990. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**, 6311-6315.

Gomez, G., and Pallas, V. 2001. Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. **Mol Plant Microbe Interact.** **14**, 910-913.

Goodman, R. N., and Novacky, A. J. 1994. The hypersensitive reaction of plants to pathogens. A resistance phenomenon. **APS Press**, St. Paul, MN.

- Gould, A. R., and Symons, R. H. 1977. Determination of the sequence homology between the four RNA species of the cucumber mosaic virus by hybridisation analysis with complementary DNA. **Nucleic Acids Res.** **4**, 3787-3802
- Gould, A. R., and Symons, R. H. 1978. **Eur. J. Biochem.** **91**, 269-278
- Guo, H. S., and Ding, S. W. 2002. A viral protein inhibits the long-range signalling activity of the gene silencing signal. **EMBO J.** **21**, 398-407.
- Habili, N., and Symons, R. H. 1989. Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. **Nucleic Acid. Res.** **17**, 9543-9555.
- Hammond-Kosack, K. E., and Parker, J. E. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Curr. Opin. Biotechnol.** **14**, 177-193.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature** **404**, 293-296.
- Harrison, B. D., Mayo, M. A., and Baulcombe, D. C. 1987. Virus resistance in transgenic plant that express Cucumber mosaic virus satellite RNA. **Nature** **328**, 799-802.
- Hatta, T., and Francki, R. I. B. 1979. Enzyme cytochemical method for identification of cucumber mosaic virus particles in infected cells. **Virology** **93**, 265-268
- Hatta, T., and Francki, R. I. B. 1981. Cytopathic structures associated with tonoplasts of plant cell infected with cucumber mosaic and tomato aspermy viruses. **J. Gen. Virol.** **53**, 343-346.
- Hayes, R. D., Tusch, D., Jacquemond, M., Pereira, V. C., Buck, K. W., and Tepfer, M. 1992. Complete replication of a satellite RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA-polymerase. **J. Gen. Virol.** **73**, 1597-1600.
- Hayes, R. J., and Buck, K. W. 1990. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. **Cell** **63**: 363-368.
- Haywood, V., Kragler, F., and Lucas, W.J. 2002. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. **Plant Cell.** **14**, Suppl: S 303-325.
- Hellwald, K. H., and Palukaitis, P. 1995. Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber mosaic virus. **Cell** **83**, 937-946.
- Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. **Nature** **329**, 219-222.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. **EMBO J.** **22**, 4523-4533.
- Hirashima, K., and Watanabe, Y. 2001. Tobamoviruses replicase coding region is involved in cell-to-cell movement. **J. Virol.** **75**, 8831-8836.
- Honda, Y., and Matsui, C. 1974. Electron microscopy of cucumber mosaic virus-infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. **Phytopathology** **64**, 534-539.

Hou, Y. M., Sanders, R., Ursin, V. M., Gilbertson, R. L. 2000. Transgenic plant expressing geminivirus movement protein: abnormal phenotypes and delayed infection by tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins. **Mol. Plant Microbe Interact.** **13**, 297-308.

Hu, C. C., Sanger, M., and Ghabrial, S. A. 1998. Production of infectious RNA transcripts from full-length cDNA clones representing two subgroups of peanut stunt virus strains: mapping satellite RNA support to RNA1. **J Gen Virol.** **79**, 2013-2021.

Huang, Z., Andrianov, V. M., Han, Y., and Howell, S. H. 2001. Identification of Arabidopsis proteins that interact with the cauliflower mosaic virus (CaMV) movement protein. **Plant Molec Biol** **47**, 663-675.

Hull, R. 2002. Matthew's Plant Virology. 4^a Edición. Academic Press.

Hull, R., and Davies, J. 1992. Approaches to non conventional control of plants viruses diseases. **Crit. Rev. Plant Sci.** **11**, 17-33.

Huppert, E., Szilassy, D., Salanki, K., Diveki, z., and Balazs, E. 2002. Heterologous movement protein strongly modifies the infection phenotype of cucumber mosaic virus. **J. Virol.** **76**, 3554-3557.

ICTB. 1995. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature viruses. 6th Report of the International Comitee on Taxonomy of Viruses. **Supp. Arch. Virol.** **10**. Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D., Ghabrial, S., Jarvis, A., Martelli, G., Mayo, M., and Symons, M. (eds.) Springer-Verlag. Wiwn. New York.

Iglesias, V. A., Meins, F. Jr. 2000. Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. **Plant J.** **21**, 157-166.

Jacquemond, M., Teycheney, P. Y., Carrère, I., Navas-Castillo, J., and Tepfer, M. 2001. Resistance phenotypes of transgenic tobacco plants expressing different Cucumber mosaic virus (CMV) coat protein genes. **Mol. Breed.** **8**, 85-94.

Ji, L. H., and Ding, S. W. 2001. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. **Mol. Plant Microbe Interact.** **14**, 715-724.

Jones, S., and Thornton, J. M. 1996. Principles of protein-protein interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**, 13-20.

Kahn, T. W., Lapidot, M., Heinlein, M., Reichel, C., Cooper, B., Gafney, R., and Beachy, R. N. 1998. Domains of the TMV movement protein involved in subcellular localization. **Plant J.** **15**, 15-25.

Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H. K., and Klessig, D. F. 2000. Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. **Plant Cell** **12**, 677-690.

Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., and Tsagris, M. 2002. The occurrence of CMV-specific short Rnas in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. **Mol. Plant Microbe Interact.** **15 (8)**, 826-833.

Kaper, J. M., and Geelen, J. L. 1971. Studies on the stabilizing forces of simple RNA viruses. II. Stability, dissociation and reassembly of cucumber mosaic virus. **J. Mol. Biol.** **56**, 277-294

Kaper, J. M., and West, C. K. 1972. Polyacrylamide gel separation and molecular weight determination of the components of CMV RNA. **Prep. Biochem** **2**, 251-263.

Kaper, J. M., and Waterworth, H. E. 1981. Cucumoviruses. **Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis- E. Kurstak (ed.)**.

Kaper, J. M., Diener, T. O., and Scott, H. A. 1965. Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (strain Y) and of its isolated ribonucleic acid. **Virology** **27**, 54-72.

Kaplan, I., Shintaku, M. H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L. E., and Palukaitis, P. 1995. Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. **Virology** **209**, 188-199.

Kaplan, I., Shintaku, M. H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L. E, and Palukaitis, P. 1995. Complementation of virus movement in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. **Virology** **209**, 188-199.

Kaplan, I., Gal-On, A., and Palukaitis, P. 1997. Characterization of Cucumber mosaic virus. III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. **Virology** **230**, 343-349.

Kaplan, I., Zhang, L., and Palukaitis, P. 1998. Characterization of Cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. **Virology** **246**, 221-231.

Karger, E. M., Frolova, O. Yu., Federova, N. V., Baratova, L. A., Ouchinnikova, T. V., Susi, P., Makinen, K., Ronnstrand, L., Dorokhov, Yu. L , and Atabekov, J. G. 2003. Dysfunctionality of a tobacco mosaic virus movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. **J. Gen Virol**, **84**, 727-732.

Kawakami, S., Hori, K., Hosokawa, D., Okada, Y., and Watanabe, Y. 2003. Defective tobamovirus movement protein lacking wild-type phosphorylation sites can be complemented by substitutions found in revertants. **J Virol**. **77**, 1452-1461.

Keen, N. T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Ann. Rev. Genet.** **24**, 447-463.

Kelley, L. A., Maccallum, R., and Sternberg, M. J. E.. 1999. Recognition of remote protein homologies using three-dimensional information to generate a position specific scoring matrix in the program3D-PSSM. RECOMB 99. **Proc. Third Annual Conference on Computational Molecular Biology**, 218-225.

Kim, S. H., and Palukaitis, P. 1997. The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. **EMBO J.16**, 4060-4068.

Kim, S. H., Palukaitis, P., and Park Y. I. 2002. Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. **EMBO J.** **21**, 2292-2300.

Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. *Phytopathogenic Prokaryotes*. Mount, M. S., and Lacy, G. H. (eds.) **Acad. Press, NY**, 149-177.

Kohli, A., Twyman, R. M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E., and Christou, P. 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Mol. Biol.** **52**, 247-258.

Koncz, C., Martini, N., Mayerhof, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G. P., and Schell, J. 1989. High-frequencyT-DNA-mediated gene tagging in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 8467-8471.

Kong, Q., Wang, J., Simon, A. E. 1997. Satellite RNA-mediated resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* involves a reduction in virus movement. **Plant Cell** **9**, 2051-2063.

Kragler, F., Monzer, J., Xoconostle-Cazares, B., and Lucas, W. J. 2000. Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. **EMBO J.** **19**, 2856-2868.

Kragler, F., Curin, M., Truntnyeva, K., Gansch, A., and Waigmann, E. 2003. MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement proteins. **Plant Physiol.** **132**, 1870-1883.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685.

Lai, M. M. 1998. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. **Virology** **244**, 1-12.

Lapidot, M., Gafni, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W. J., and Beachy, R. N. 1993. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. **Plant J.** **4**, 959-970.

Lazarowitz, S. G., and Beachy, R. N. 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. **Plant Cell** **11**, 535-548.

Lee, J. Y., and Lucas, W. J. 2001. Phosphorylation of viral movement proteins-regulation of cell-to-cell trafficking. **Trends Microbiol.** **9**, 5-8.

Lee, W. M., Ishikawa, M., and Ahlquist, P. 2001. Mutation of host 9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. **J. Virol.** **75**, 2097-2106.

Leisner, S. M., and Turgeon, R. 1993. Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. **Bioessays.** **15**, 741-748.

Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. **Curr Biol.** **12**, 1046-1051.

Li, Q., and Palukaitis, P. 1996. Comparison of the nucleic acid- and NTP- binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. **Virology** **216**, 71-79.

Li, W. X., Ryu, K. H., and Palukaitis, P. 2001. Cucumber mosaic virus-plant interactions. Identification of 3a protein sequences affecting infectivity, cell-to-cell movement, and long distance movement. **Mol Plant Microbe Interact.** **14**, 378-385.

Lim, S. H., Ko, M. K., Lee, S. J., La, Y. J., and Kim, B. D. 1999. Cymbidium mosaic virus coat protein gene in antisense confers resistance to transgenic *Nicotiana occidentalis*. **Mol. Cell** **9**, 603-608.

Lin, B., and Heaton, L. A. 2001. An *Arabidopsis thaliana* protein interacts with a movement protein of Turnip crinkle virus in yeast cells and in vitro. **J Gen Virol** **82**, 1245-1251.

Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A., Jiménez, M., and Falk, B. W. 2003. Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber mosaic virus. **J. Gen. Virol.** **84**, 249-258.

- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., and Dougherty, W. G. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell** **5**, 1749-1759.
- Liu, S., He, X., Park, G., Josefsson, C., and Perry, K. L. 2002a. A conserved capsid protein surface domain of Cucumber mosaic virus is essential for efficient aphid vector transmission. **J Virol.** **76**, 9756-9762.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S. P. 2002b. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant J.** **30**, 415-429.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. **Anal. Biochem.** **163**, 16-20.
- Lomonossoff, G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plants virus. **Annu. Rev. Phytopathol.** **33**, 323-343.
- Lot, H., Marrou, J., Quiot, J. B., and Esvan, C. 1972. Contribution a l'étude de virus de la mosaïque du concombre (CMV). II. Methode de purification rapide du virus. **Annu. Phytopathol** **4**, 25-38.
- Lucas, W. J., and Wolf, S. 1999. Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. **Curr. Opin. Plant Biol.** **2**, 192-197.
- Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., and Ding, S. W. 2000. Suppression of post-translational gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. **EMBO J.** **19**, 1672-1680.
- MacFarlane, S. A., and Davies, J. W. 1992. Plants transformed with a region of the 201 kDa replicase gene from pea early browning virus RNA 1 are resistant to virus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**, 5829-5833.
- MacGuffin, L. J., and Jones, D. T. 2003. Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. **Bioinformatics** **19**, 874-881.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., and Dang, J. L. 2003. Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. **Cell** **112**, 379-389.
- Malysenko, S. I., Kondakova, O. A., Nazarova, JuV., Kaplan, I. B., Atabekov, J. G. 1993. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. **J. Gen. Virol.** **74**, 1149-1156.
- Mayers, C. N., Palukaitis, P., and Carr, J. P. 2000. Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. **J. Gen. Virol.** **81**, 219-226.
- Martelli, G. P., and Russo, M. 1985. Virus- host relationships: symptomatological and structural aspects. **R.I.B. Francki (cd.), Polyhedral virions with tripartite genomes**, 163-205. Plenum Press, New York, N. Y.
- Mas, P., and Beachy, R. N. 1999. Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intercellular distribution of viral RNA. **J. Cell Biol.** **147**, 945-958.

Masuta, C., Ueda, S., Suzuki, M., and Uyeda, I. 1998. Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**, 10487-10492.

Matsushita, Y., Yoshioka, K., Shigyo, T., Takahashi, H., and Nyunoy, H. 2002a. Phosphorylation of the movement protein of cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Virus Genes** **24**, 231-234.

Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M., Nyunoya, H. 2002b. Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. **J Exp Bot.** **53**, 1531-1532.

Mayers, C. N., Palukaitis, P., and Carr, J. P. 2000. Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. **J. Virol.** **81**, 219-226.

Melcher, U. 1990. Similarities between putative transport proteins of plant viruses. **J. Gen. Virol.** **71**, 1009-1018.

Melcher, U. 2000. The "30K" superfamily of viral movement proteins. **J. Gen. Virol.** **81**, 257-266.

Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T., and Okada, Y. 1987. Function of the 30kd protein tobacco mosaic virus: Involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. **EMBO J.** **6**, 2557-2563.

Mestre, P., Brigneti, G., and Baulcombe, D. C. 2000. An Ry-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the Nia proteinase from potato virus Y. **Plant J.** **23**, 653-661.

Mezzit, L. A., and Lucas, W. J. 1996. A role for macromolecular trafficking in floral morphogenesis. Presented at Int. Workshop Basic Appl. Res. Plasmodesmal Biol. 3rd, pp 82-86. Zichron-Yakov, Israel.

Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M. F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S. W., Pruss, G., and Vance V. B. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. **Plant Cell**, S289- S301.

Moller, S., Croning, M. D. R., and Apweiler, R. 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics** **17**, 646-653.

Moreno, I. M, Malpica, J. M, Rodriguez-Cerezo, E., Garcia-Arenal, F. 1997. A mutation in tomato aspermy cucumovirus that abolishes cell-to-cell movement is maintained to high levels in the viral RNA population by complementation. **J Virol.** **71**, 9157-9162.

Mori, M., Mise, K., Okuno, T., and Furusawa, I. 1992. Expression of brome mosaic virus-encoded replicase genes in transgenic tobacco plants. **J. Gen. Virol.** **73**, 162-172.

Morozov, S .Y, and Solovyev, A. G. 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. **J. Gen. Virol.** **84**, 1351-1366.

Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brignetti, G., and Baulcombe, D. C. 1995. Homology-dependent resistance : transgenic virus resistance in plant related to homology-dependent gene silencing. **Plant J.** **7**, 1001-1013.

Murant, A. F., and Mayo, M. A. 1982. Satellites of plant viruses. **Ann. Rev. Phytopathol** **20**, 49-70.

Murphy, A. M., Chivasa, S., Singh, D. P., and Carr, J. P. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways?. **Trends Plant Sci.** **4**, 155-160.

- Mushegian, A. R., and Koonin, E. V. 1993. The proposed plant connexion is a protein-kinase-like protein. **Plant Cell** **5**, 998-999.
- Ng, J. C., Liu, S., Perry, K. L. 2000. Cucumber mosaic virus mutants with altered physical properties and defective in aphid vector transmission. **Virology** **276**, 395-403.
- Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., and Furusawa, I. 1997. Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. **J. Virol.** **71**, 2270-2276.
- Nagano, H., Mise, K., Okuno, T., and Furusawa, I. 1999. The cognate coat protein is required for cell-to-cell movement of a chimeric brome mosaic virus mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. **Virology** **265**, 226-234.
- Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., and Okuno, T. 2001. Conversion in the Requirement of Coat Protein in Cell-to-Cell Movement Mediated by the Cucumber Mosaic Virus Movement Protein. **J. Virol.** **75**, 8045-8053
- Nakajima, M., Hayakawa, T., Nakamura, I., and Suzuki, M. 1993. Protection against cucumber mosaic virus (CMV) strains O and Y and chrysanthemum mild mottle virus in transgenic tobacco plants expressing CMV-O coat protein. **J. Gen. Virol.** **74**, 319-322.
- Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Gonsalves, D., and Slightom, J. L. 1991. Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain W-L appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strain. **Gene** **107**, 181-88
- Nelson, R. S., and van Bel, A. J. E. 1998. The mystery of viruses trafficking into, through and out of the vascular tissue. **Prog. Bot.** **59**, 476-533.
- Nguyen, L., Lucas, W. J., Ding, B., and Zaitlin, M. 1996. Viral RNA trafficking is inhibited in replicase-mediated resistant transgenic tobacco plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**, 12643-12647.
- Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S., and Kubo, S. 1988. Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplast. **J. Gen. Virol.** **69**, 2695-2700.
- Noueiry, A. O., Diez, J., Falk, S. P., Chen, J., Ahlquist, P. 2003. Yeast Lsm1p-7p/Pat1p deadenylation-dependent mRNA-decapping factors are required for brome mosaic virus genomic RNA translation. **Mol Cell Biol.** **23**, 4094-4106.
- Okuno, T., Nakayama, M., Yoshida, S., Furusawa, I., and Komiya, T. 1993. Comparative susceptibility of transgenic tobacco plants and protoplast expressing coat protein gene of cucumber mosaic virus to infection with virions and RNA. **Phytopathology** **83**, 542-547.
- Oparka, K. J., and Santa Cruz, S. 2000. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **51**, 323-347.
- O'Reilly, E. K., Paul, J. D. and Kao, C. C. 1997. Analysis of the interaction of viral RNA replication proteins by using the yeast two-hybrid assay. **J. Virol.** **71**, 7526-7532.
- Overall, R. L., and Blackman, L. H. 1996. A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. **Trends Plant Science** **1**, 307-311.

Owens, R. A, Blackburn, M., and Ding, B. 2001. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. **Mol Plant Microbe Interact.** **14**, 905-909.

Palukaitis, P., and Zaitlin, M. 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. **Adv. Virus Res.** **48**, 349-377.

Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G., and Francki, R. I. B. 1992. Cucumber mosaic virus. **Adv. Virus Res.** **41**, 281-348.

Pandolfini, T., Molesini, B., Avesani, L., Spena, A., and Polverari, A. 2003. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. **BMC Biotechnol.** **25**, 7.

Pang, S. Z., Jan, F. J., Carney, K., Stout, J., Tricoli, D. M., *et al.* 1996. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. **Plant J.** **9**, 899-909.

Peach, C., and Velten, J. (1991) Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. **Plant Mol. Biol.** **7**, 49-60.

Peng, C. W., Napuli, A. J., and Dolja, V. V. 2003. Leader Proteinase of Beet Yellow Virus Functions in Long-Distance Transport. **J. Virol.** **77**, 2843-2849.

Perry, K. L., Francki, R. I. 1992. Insect-mediated transmission of mixed and reassorted cucumovirus genomic RNAs. **J Gen Virol.** **73**, 2105-2114.

Perry, K. L. Zhang, L., Palukaitis, P. 1998. Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. **Virology** **242**, 204-210.

Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V. 2002. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. **J Virol.** **76**, 6815-6824.

Pickard, B. G, Beachy R. N. 1999. Intercellular connections are developmentally controlled to help move molecules through the plant. **Cell.** **98**, 5-8.

Pirone, T. P, and Megahed, S. 1966. Aphid transmissibility of some purified viruses and viral RNA's. **Virology** **30**, 631-637.

Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., *et al.* 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science** **232**, 738-743.

Prins, M. 2003. Broad virus resistance in transgenic plants. **Trends Biotechnol.** **21**, 373-375.

Prins, M., Kikkert, M., Ismayadi, C., de Graauw, W., de Haan, P., and Goldbach, R. 1997. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants expressing NS(M) gene sequences. **Plant Mol. Biol.** **33**, 235-243.

Prokhnovsky, A. I., Peremyslov, V. V., Napuli, A. J., Dolja, V. V. 2002. Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of beet yellows virus. **J. Virol.** **76**, 11003-11011.

Qu, F., Ren, T., and Morris, T. J. 2003. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. **J Virol.** **77**, 511-522.

- Quemada, D. H., Gonsalves, D., and Slighon, J. L. 1991. Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: protection against infections by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. **Phytopathology** **81**, 794-802.
- Reichel, C., and Beachy, R. N. 2000. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. **J. Virol.** **74**, 3330-3337.
- Reichel, C., Más, P., and Beachy, R. N. 1999. The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. **Trends Plant Sci.** **4**, 458-462.
- Rohfritsch, O., Poirson, A., Turner, A., Gagey, M.J., Roberts, K., Stussi-Garaud, C., and Godefroy-Colburn, T. 1996. A modified form of the alfalfa mosaic virus movement protein induces stressed phenotypes in transgenic tobacco. **Can. J. Bot.** **74**, 939-951.
- Roossinck, M. J.. 2002. Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus Deduced by Phylogenetic Analyses. **J. Virol.** **76**, 3382-3387.
- Roossinck, M. J., and Palukaitis, P. 1990. Rapid induction and severity symptoms in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) map to RNA 1 of cucumber mosaic virus. **Mol. Plant Microbe Interact.** **3**, 188-192.
- Roossinck, M. J., Sleat, D., and Palukaitis, P. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: Structures and biological effects. **Microbiological Reviews** **56**, 265-279.
- Roossinck, M. J, Kaplan, I., Palukaitis, P. 1997. Support of a cucumber mosaic virus satellite RNA maps to a single amino acid proximal to the helicase domain of the helper virus. **J Virol.** **71**, 608-612.
- Roossinck, M. J., Zhang, L., and Hellwald, K. H. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. **J. Virol** **73**, 6752-6758
- Rost, B. 1995. TOPITS: Threading one-dimensional predictions into three-dimensional structures. "The third international conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB)", 314-321. In: C Rawlings, D Clark, R Altman, L Hunter, T Lengauer & S Wodak (eds.)
- Rost, B. 1996. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. **Methods in Enzymology** **266**, 525-539.
- Rost, B., and Sander, C. 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. **J. Mol. Biol.** **232**, 584-599.
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V., and Gorbalenya, A. E. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. **J. Gen. Virol.** **73**, 2129-2134.
- Rubio-Huertos, M. 1978. Atlas on ultrastructure of plants tissues infected with viruses. (C.S.I.C. Madrid).
- Rudolph, C., Schreier, P. H., Uhrig, J. F. 2003. Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **15**, 4429-4434.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor4E (eIF4E). **Plant J.** **32**, 1067-75.

Ruiz-García, L., Madueno, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J., and Martínez-Zapater, J. M. 1997. Different roles of flowering-time genes in the actuation of floral initiation genes in Arabidopsis. **Plant cell** **9**, 1931-1934.

Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B., and Lucas, W. J. 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. **Curr Opin Plant Biol.** **4**:, 202-209.

Ryabov, E. V., Robinson, D. J., and Taliansky, M. E. 1999a. A plant virus-encoded facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. **Proc. Natl. Acad. Science. USA** **96**, 1212-1217.

Ryabov, E. V., Roberts, I. M., Palukaitis, P., and Taliansky, M. E. 1999b. Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus. **Virology** **260**, 98-108.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., and Hunt, M. D. 1996. Systemic Acquired Resistance. **Plant Cell.** **8**, 1809-1819.

Ryan, C. A, Pearce, G. 2003. Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** PMID: 12949-12964.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory. NY.

Sanford, J. C., and Johnston, S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. **J. Theor. Biol.** **115**, 395-405.

Sanz, A. I. 1996. El virus del mosaico del pepino. Análisis de la función de la proteína p3a y efecto de la expresión de secuencias derivadas del gen 3a en la infección viral. Tesis Doctoral (CIB. CSIC.)

Sanz, A. I., Serra, M. T., and García-Luque, I. 2000. Altered local and systemic spread of movement deficient virus in transgenic tobacco plant expressing the cucumber mosaic virus 3a protein. **Arch. Virol.** **145**, 2387-2401

Schmitz, I., and Rao, A. L. N. 1998. Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but not abolish infectivity and cell-to-cell movement. **Virology** **248**, 323-331.

Seppanen, P., Puska, R., Honkanen, J., Tyulkin, L.G., Fedorkin, O., Morozov, S. Yu., Atabekov, J. G. 1997. Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plants viruses. **J. Gen. Virol.** **78**, 1241-1246.

Shi, B. J., Miller, J., Symons, R. H., and Palukaitis, P. 2003. The 2b protein of Cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. **Mol. Plant Microbe Interact.** **16**, 261-267.

Shi, J., Blundell, T. L., and Mizuguchi, K. 2001. FUGUE: Sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. **J. Mol. Biol.** **310**, 243-257.

Shintaku, M. H., Zhang, L., and Palukaitis, P. 1992. A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. **Plant Cell** **4**, 751-757.

Sijen, T., Wellink, J., Hiriart, J. B., Van Kammen, A. 1996. RNA-mediated resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. **Plant Cell** **8**, 2277-2294.

Smith, T.J., Chase, E., Schmidt, T., Perry, K.L. 2000. The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus. **J Virol.** **74**, 7578-7586.

Sivakumaran, K., Bao, Y., Roossinck, M. J., and Kao, C. C. 2000. Recognition of the core RNA promoter for minus-strand RNA synthesis by the replicases of brome mosaic virus and cucumber mosaic virus. **J. Virol.** **74**, 10323-10331.

Smirnyagina, E., Lin, E. N., and Ahlquist, P. 1996. The polymerase-like core of brome mosaic virus 2a protein, lacking a region interacting with viral 1a protein in vitro, maintains activity and 1a selectivity in RNA replication. **J. Virol.** **70**, 4729-4736.

Soellick, T. R., Uhrig, J. F., Bucher, G. L. and Schreier, P. H. (2000) The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein and identification of interacting plant proteins. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** **97**, 2373-2378.

Sullivan, M., and P. Ahlquist. 1997. Cis-acting signals in bromovirus RNA replication and gene expression: networking with viral proteins and host factors. **Semin. Virol.** **8**, 221-230.

Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N., and Takanami, Y. 1991. Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA 3 using an in vitro transcription system. **Virology** **183**, 106-113.

Suzuki, M., Kuwata, S., Masuta, C., and Takanami, Y. 1995. Point mutations in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptoms expression and virion accumulation in tobacco. **J. Gen. Virol.** **76**, 1791-1799.

Suzuki, M., Masuta, C., Takanami, Y., and Kuwata, S. 1996. Resistance against cucumber mosaic virus in plant expressing the viral replicon. **FEBS Lett.** **379**, 26-30

Suzuki, M., Yoshida, M., Yoshinuma, T., and Hibi, T. 2003. Interaction of replicase components between Cucumber mosaic virus and Peanut stunt virus. **J Gen Virol.** **84**, 1931-1939.

Szilassy, D., Salanki, K., and Balazs, E. 1999. Stunting induced by cucumber mosaic cucumovirus-infected *Nicotiana glutinosa* is determined by a single amino acid residue in the coat protein. **Mol. Plant Microbe Interact.** **2**, 1105-1113.

Tacke, E., Salamini, F., and Rohde, W. 1996. Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. **Nat. Biotechnol.** **14**, 1597-1601.

Takahashi, H., and y Ehara, Y. 1993. Severe chlorotic spot symptoms in cucumber mosaic virus strain Y-infected tobaccos are induced by combination of the virus coat protein gene and two host recessive genes. **Mol. Plant Microbe Interact.** **6**, 182-189.

Takahashi, H., Suzuki, M., Natsuaki, K., Shigyo, T., Hino, K., Teraoka, T., Hosokawa, D., and Ehara, Y. 2001. Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** **42**, 340-347.

Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Sukanto, Takeda, M., Shah, J., Hase, S., Ikegami, M., Ehara, Y., and Dinesh-Kumar, S. P. 2002. RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. **Plant J.** **32**, 655-667.

Takeshita, M., Suzuki, M., Kuwata, S., and Takanami, Y. 1998. Involvement of cucumber mosaic cucumovirus RNA 2 and RNA 3 in viral systemic spread in radish plant. **Arch. Virol.** **143**, 1109-1117.

Takeshita, M., Suzuki, M., and Takanami, Y. 2001. Combination of amino acids in the 3a protein and the coat protein of Cucumber mosaic virus determines symptom expression and viral spread in bottle gourd. **Arch. Virol.** **146**, 697-711.

Taliansky, M. E., and García-Arenal, F. 1995. Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. **J. Virol.** **69**, 916-922.

Taliansky, M., Roberts, I. M., Kalinina, N., Ryabov, E. V., Raj, S. K., Robinson, D. J., and Oparka, K. J., 2003. An Umbraviral Protein, Involved in Long-Distance RNA Movement, Binds Viral RNA and Forms Unique, Protective Ribonucleoprotein Complexes. **J. Virol.** **77**, 3031-3040.

Tayon, R. Jr., Kim, M. J., and Kao, C. 2001. Completion of RNA synthesis by viral RNA replicases. **Nucleic Acid Res.** **29**, 3576-3582.

Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruiz, J.R. 1994. Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. **J. Virol. Methods** **47**, 165-174.

Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M. T., and Díaz-Ruiz, J. R. 1995. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54 kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistant responses against viral infection. **Virology** **211**, 170-183.

Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M. T., and Díaz-Ruiz, J. R. 1996. Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by the 54 kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression of the wild type 54 kDa protein. **Virology** **219**, 330-335.

Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** **40**, 467-491.

Thomas, C. L., Leh, V., Lederer, C., and Maule, A.J. 2003. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. **Virology** **306**, 33-41.

Thompson, J. R., and García-Arenal, F. 1998. The bundle-sheath phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by tomato aspermy virus. **Mol. Plant Microbe Interact.** **11**, 109-114.

Tomita, Y., Mizuno, T., Diez, J., Naito, S., Ahlquist, P., and Ishikawa, M. 2003. Mutation of host DnaJ homolog inhibits brome mosaic virus negative-strand RNA synthesis. **J Virol.** **77**, 2990-2997.

Traynor, P., and Ahlquist, P. 1990. Use of bromovirus RNA 2 hybrids to map cis and trans-acting functions in a conserved RNA replication gene. **J. Virol.** **64**, 69-77.

Tsujimoto, Y., Numaga, T., Ohshima, K., Yano, M. A., Ohsawa, R., Goto, D. B., Naito, S., and Ishikawa, M. 2003. Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. **EMBO J.** **22**, 335-343.

Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M. H., Kunik, T., and Citovsky, V. 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. **Annu. Rev. Microbiol.** **54**, 187-219.

Ueki, S., Citovsky, V. 2002. The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. **Nat. Cell Biol.** **4**, 478-486.

- Ulhrig, J. F. 2003. Response to Prins: Broad virus resistance in transgenic plants. **Trends Biotechnol** **21**, 376-377.
- Vaquero, C., Turner, A. P., Demangeat, G., Sanz, A., Serra, M. T., Roberts, K., and García-Luque, I. 1994. The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. **J. Gen. Virol.** **75**, 3193-3197.
- Vaquero, C., Sanz, A. I., Serra, M. T., and García-Luque, I. 1996. Accumulation kinetics of CMV RNA 3-encoded proteins and subcellular localization of the 3a protein in infected and transgenic tobacco plants. **Arch. Virol.** **141**, 987-999.
- Vaquero, C., Liao, Y.C., Nahring, J., and Fischer, R. 1997. Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein. **J. Gen. Virol.** **78**, 2095-2099.
- van der Biezen, E. A., and Jones, J. D. G. 1998. Plant disease resistance proteins and the 'gene-for-gene' concept. **Trends Biochem. Sci.** **23**, 454-456.
- Vilar, M., Esteve, V., Palla's, V., Marcos, J.F., Pérez-Payá, E. 2001. Structural properties of Camation Mottle Virus p7 movement protein and its RNA-binding domain. **J. Biol. Chem.** **276**, 18122-18129.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends Genet** **17**, 449-459.
- Wagmann, E., Lucas, W. J., Citovsky, V., and Zambryski, P. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**, 1433-1437.
- Waterhouse, P., Gramham, M., and Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**, 13959-13964.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. 2001a. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. **Nature** **411**, 834-842.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Finnegan, E. J. 2001b. Role of short RNAs in gene silencing. **Trends Plant Sci.** **6**, 297-301.
- Watson, M. A., and Plumb, R. T. 1973. Transmission of plant-pathogenic viruses by aphids. **Ann. Rev. Entomology** **17**, 425-452.
- Whitham, S., McCormick, S., and Baker, B. 1996. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**, 8776-8781.
- Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T., and Carrington, J. C. 2000. Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. **Plant Cell** **12**, 569-82.
- Wilson, M. T. A. 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**, 3234-3241.
- Wintermantel, W. M., and Zaitlin, M. 2000. Transgene translatability increases effectiveness of replicase-mediated resistance to Cucumber mosaic virus. **J. Gen. Virol.** **81**, 587-595.

Wintermantel, W. M., Banerjee, N., Oliver, J. C., Paolillo, D. J., and Zaitlin, M. 1997. Cucumber mosaic virus is restricted from entering minor veins in transgen tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. **Virology** **231**, 248-257.

Wong, S. M., Thio, S. S.C., Shintaku, M. H., and Palukaitis, P. 1999. The rate of cell-to-cell movement in squash of cucumber mosaic virus is affected by sequences of the capsid protein. **Mol. Plant Microbe Interact.** **12**, 628-632.

Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S., and Ishikawa, M. 2000. TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **97**, 10107-10112.

Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M. 2002. Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. **J. Virol.** **76**, 2491-2497.

You, J. S., Baik, H. S., and Paek, K. H. 1999. Mutational analysis of cucumber mosaic virus movement protein gene. **J. Biochem. Mol. Biol.** **32**, 82-85.

Zaitlin, M., Anderson, J. M., Perry, K. L., Zhang, L., and Palukaitis, P. 1994. Specificity of replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus. **Virology** **201**, 200-205.

Zambryski, P. and Crawford, K. 2000. PLASMODESMATA: Gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** **16**, 393-421.

Resumen

Con objeto de profundizar en el conocimiento de la proteína 3a del virus del mosaico del pepino (CMV) y explorar la posibilidad de utilizarla como un sistema de control de las virosis, el presente trabajo se ha centrado en la caracterización funcional de una serie de mutantes de delección de p3a, así como en el análisis de su capacidad para conferir resistencia a plantas de tabaco cuando son expresadas constitutivamente.

El análisis funcional de los mutantes mostró que algunos de ellos mantienen su actividad, restaurando los movimientos a corta y larga distancia de un virus defectivo para esta función (mutantes M2 y M8) o tan sólo a corta distancia (mutante M9), indicando que los dominios aminoácidicos 134-143; 193-203 y 204-213 de la proteína son dispensables para el transporte viral. Por el contrario, los dominios ubicados entre los aminoácidos 144-153 (mutante M3); y 164-183 (mutantes M5 y M6) son requeridos para su actividad.

Por otro lado, el estudio del efecto de su expresión constitutiva en plantas de tabaco sobre la infección del virus homólogo mostró que la expresión de las dos proteínas funcionales para ambos movimientos incrementan la susceptibilidad de la planta a la infección. Así, detectamos un aumento transitorio de la carga viral y a veces, de la intensidad de los síntomas. Por el contrario, la expresión de los otros transgenes protege a la planta frente a la infección, manifestándose en una caída de la acumulación viral en las hojas inoculadas, que puede ir acompañada de una inhibición de la invasión sistémica. La eficacia de la protección depende del transgén.

Finalmente, la expresión del transgén M10, que codificaría para un péptido de 46 aa correspondiente a la región N terminal de la proteína, bloquea la dispersión sistémica del virus homólogo.

Palabras clave: Resistencia, Complementación, Virosis

Functional analysis of CMV movement protein deletion mutants constitutively expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* plants

In order to get further insights in the CMV movement protein, and to explore the possibility to use it for the control of plant virus diseases, we have carried out the functional analysis of several deletion mutants of the protein. In addition, we have investigated the effect of their transgenic expression on tobacco plants upon the infection of the homologous virus: CMV-24.

Complementation tests carried out with a movement-deficient virus showed that **i**: two of the mutants were fully active for the movement function; **ii**: one mutant only rescued the short-distance movement function of the defective virus and **iii**: three other mutants were afunctional. The data thus indicate that within the 3a protein, aa domains 134-143; 193-203 and 204-213 are dispensable for the cell-to-cell viral spread. By contrast, aa domains 144-153 (mutant M3); and 164-183 (mutants M5 y M6) are required, being indicative of their implication in the 3a activity.

On the other hand, the analysis of their constitutive expression upon the homologous viral infection revealed that the expression of the two mutants found to be functionally active increased the host susceptibility towards the viral infection. A transitory increased viral accumulation as well as an exacerbation of viral symptoms were detected. By contrast, the expression of the other transgenes protect the plants against the infection. It was manifested by a reduction in the viral content of the inoculated leaves as well as by the retardation or even suppression of symptom development. In some cases, and depending upon the transgene, an inhibition of the viral systemic spread was also detected.

Finally, the expression of construct M10 lead to the blockage of viral the systemic invasion putatively, with no detectable effect on the inoculated leaves. This construct putatively encodes a 46 aa-long peptide corresponding to the 3a protein N-terminus.